

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DEL GEN CARD15 EN UVEÍTIS  
IDIOPÁTICA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Noelia Rodríguez Pérez**

Bajo la dirección de los doctores

José Manuel Martín Villa  
Marina Begoña Gorroño Echebarría  
Mercedes Pérez Blas

**Madrid, 2010**

- **ISBN: 978-84-693-0714-4**

**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**ANÁLISIS DEL GEN CARD15 EN UVEÍTIS  
IDIOPÁTICA**

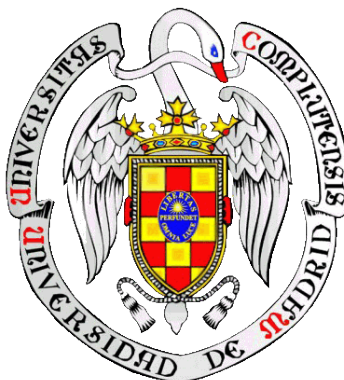


**TESIS DOCTORAL**

**NOELIA RODRÍGUEZ PÉREZ  
MADRID 2009**



**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**ANÁLISIS DEL GEN CARD15 EN UVEÍTIS IDIOPÁTICA**

**TESIS DOCTORAL**

**NOELIA RODRÍGUEZ PÉREZ**

**MADRID 2009**

## **TESIS DOCTORAL**

# **ANÁLISIS DEL GEN CARD15 EN UVEÍTIS IDIOPÁTICA**

AUTOR: NOELIA RODRÍGUEZ PÉREZ

DIRECTORES: Dr. JOSÉ MANUEL MARTÍN VILLA  
Dr. MARINA BEGOÑA GORROÑO ECHEBARRÍA  
Dr. MERCEDES PÉREZ BLAS

LUGAR DE REALIZACIÓN: ÁREA DE INMUNOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Fdo. Autor

Noelia Rodríguez Pérez

VºBº Director de Tesis

José Manuel Martín Villa

VºBº Director de Tesis

Marina Begoña Gorroño Echebarría

VºBº Director de Tesis

Mercedes Pérez Blas

**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
MADRID 2009**

Dibujo de la portada ojo de Horus.

El final se acerca para este período de mi vida y llega el momento de hacer balance, de echar la vista atrás sobre el camino recorrido. Tras esta reflexión obligada, debo admitir que tal vez no sea ni mejor ni peor persona pero sí diferente, de eso estoy segura. Muchas han sido las experiencias vividas con la gente de mi entorno laboral, familia y amigos.

Me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, en especial a José Manuel Martín Villa por su ayuda durante estos años y a Marina Gorroño Echebarría por aportarnos las muestras sin las que este trabajo no hubiera sido posible, del mismo modo, hago extensivas mis gracias al Dr. Vicario Moreno que amablemente nos cedió muestras de ADN de individuos control, a Cristina Rodríguez por su ayuda en la puesta a punto de los ELISAs y al servicio de inmunología del Hospital Clínico, por permitirme usar su termociclador. Tampoco querría olvidarme de las personas con las que he convivido a lo largo de estos años: Ana (por ser tan buena compañera de trabajo), Vero y Alberto (sois grandes compañeros de trabajo pero mejores amigos), los “pajaritos” y demás compañeros del departamento, mi amiga de siempre Mary y Luis, Lupe y Mario y en general la familia Yuste Armenteros, Reyes y Javi, Javi y Yolanda, mis compañeras y profesora de danza oriental, en especial Inés y María,...(a mi familia en realidad debería estar dándole las gracias todos los días, por aguantar mi mal genio).

Se suele decir que una persona es lo que ha vivido, por eso quiero daros las gracias, por ser parte de lo que he vivido y por haberme apoyado laboral y personalmente, permitiendo que avance en este viaje. Gracias por vuestros consejos, compañía, ayuda con los experimentos, las prácticas, artículos, tesis... Gracias también porque hemos compartido celebraciones, conciertos, layalis, nacimientos, paseos, barbacoas, viajes, peleas con el inglés y buenos momentos sin más, y porque los disgustos han sido menores gracias a vosotros.

Sólo me queda desear que esto no sea una despedida, sino un hasta luego.

*Sed como la fuente que se derrama y no como el tanque que  
siempre contiene la misma agua.*

Paulo Coelho



## RESUMEN

Nod2 es un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) citoplásmico, perteneciente a la familia de receptores de tipo NOD (NLR) y consta de tres tipos de dominios estructurales y funcionales distintos: dos dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) en el extremo amino-terminal, un dominio central de unión a nucleótidos (NBD) y un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR) en el extremo carboxi-terminal. Este último, permite el reconocimiento de muramil dipéptido (producto resultante de la ruptura del peptidoglicano, presente en gran cantidad de patógenos), lo cual conduce en última instancia a la activación de dos rutas de señalización: la de las MAP quinasas y la del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que regulan la transcripción de gran número de genes.

Nod2 está codificada por el gen CARD15, situado en el brazo largo del cromosoma 16. Dicho gen consta de 12 exones y diferentes mutaciones en él, se han asociado a susceptibilidad a padecer distintas enfermedades, entre las que se encuentran la enfermedad de Crohn y el síndrome de Blau. Las mutaciones asociadas a susceptibilidad a padecer Crohn afectan principalmente al dominio LRR de la molécula (P268S, R702W, G908R, L1007fsinsC) mientras que las mutaciones asociadas a susceptibilidad a padecer síndrome de Blau (R334W, R334Q, L469F) se sitúan en el dominio NBD. Dado que la enfermedad de Crohn puede cursar con uveítis y que la uveítis, además de ser una manifestación del síndrome de Blau, se presenta también como una patología independiente, el objetivo de nuestro trabajo ha sido determinar si los principales polimorfismos de CARD15 (antes mencionados) pueden asociarse a susceptibilidad a padecer uveítis idiopática o infecciosa. Por otro lado, también se ha pretendido estudiar los niveles de autoanticuerpos frente  $\alpha$ -cristalina en pacientes con uveítis idiopática en la población española, puesto que estudios previos han puesto de manifiesto la presencia de autoanticuerpos frente a proteínas del cristalino en el suero de pacientes con uveítis.

Los resultados obtenidos no han permitido encontrar un marcador diferencial de uveítis idiopática ni de uveítis infecciosa, de entre los polimorfismos considerados. Tampoco se ha encontrado, en la muestra estudiada, ninguna asociación entre uveítis y los niveles de autoanticuerpos frente a  $\alpha$ -cristalina.

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1-24</b>
1.1 GEN CARD15 Y PROTEÍNA Nod2	2
1.1.1 RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE Nod2	7
1.1.2 EXPRESIÓN DE Nod2	8
1.2 MUTACIONES EN CARD15 Y SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD	8
1.2.1 ENFERMEDAD DE CROHN	8
1.2.1.1 Mutaciones en Nod2 y aparición de EC	10
1.2.2 SÍNDROME DE BLAU	14
1.2.3 UVEÍTIS	16
1.2.3.1 Tratamiento	17
1.2.3.2 Patogenia y clasificación	17
1.2.3.3 Autoanticuerpos frente a $\alpha$ -cristalina	21
1.2.4 CÁNCER GÁSTRICO Y CARD15	22
1.3 MODELO MURINO	23
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>25-26</b>
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>27-43</b>
3.1 SUJETOS EXPERIMENTALES	28
3.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS	33
3.3 SECUENCIACIÓN DIRECTA DE CARD15	33
3.3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	33
3.3.2 EXTRACCIÓN DE ADN	33
3.3.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN CARD15	34
3.3.4 SECUENCIACIÓN DE ADN	36
3.3.5 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	36
3.4 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC	36

3.5 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER SÍNDROME DE BLAU	40
3.6 DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN SUEROS DE PACIENTES CON UVEÍTIS	42
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	43
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>44-61</b>
4.1 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS EXONES DEL GEN CARD15	45
4.2 POLIMORFISMOS DE CARD15 ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC EN PACIENTES CON UVEÍTIS IDIOPÁTICA	51
4.3 POLIMORFISMOS DE CARD15 ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER SB	55
4.4 RESULTADOS EN EL GRUPO DE PACIENTES CON UVEÍTIS INFECCIOSA	57
4.5 POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	58
4.6 AUTOANTICUERPOS FRENTE A $\alpha$ -CRISTALINA	59
<b>5 DISCUSIÓN</b>	<b>62-70</b>
5.1 POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC	63
5.2 POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER SB	65
5.3 POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC Y SB EN PACIENTES CON UVEÍTIS INFECCIOSAS	67
5.4 POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO	69
5.5 AUTOANTICUERPOS FRENTE A $\alpha$ -CRISTALINA	70

<b>6 CONCLUSIONES</b>	<b>71-72</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>73-80</b>
<b>ANEXO</b>	<b>81</b>

# **ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Modelo de los distintos dominios de la proteína Nod2 y su correlación con los doce exones del gen CARD15	4
<b>Figura 2.</b> Señalización de Nod2	6
<b>Figura 3.</b> Localización en el dominio LRR de la proteína Nod2 de las tres variantes asociadas a enfermedad de Crohn	11
<b>Figura 4.</b> Modelo de las hipótesis propuestas para explicar la inflamación intestinal en las variantes de Nod2	13
<b>Figura 5.</b> Localización de los polimorfismos asociados a padecer enfermedad de Crohn y Síndrome de Blau	15
<b>Figura 6.</b> Localización de las partes anatómicas del ojo que componen la úvea	19
<b>Tabla 1.</b> Características clínicas de los pacientes con uveítis idiopática e infecciosa estudiados	29
<b>Tabla 2.</b> Resumen de las características clínicas de los pacientes con uveítis idiopática estudiados	31
<b>Tabla 3.</b> Resumen de las características clínicas de los pacientes con uveítis infecciosa estudiados	32
<b>Tabla 4.</b> Características clínicas de los pacientes con uveítis idiopática empleados para detectar autoanticuerpos frente a $\alpha$ -cristalina	32
<b>Tabla 5.</b> Resumen de las características clínicas de los pacientes con adenocarcinoma gástrico	32
<b>Tabla 6.</b> Cebadores empleados para realizar las reacciones de amplificación de los exones del gen CARD15	35
<b>Figura 7.</b> Fundamento de la técnica de genotipado por sonda TaqMan	38
<b>Tabla 7.</b> Reacción de PCR realizada para la discriminación alélicas	38
<b>Tabla 8.</b> Condiciones de la PCR realizada en el termociclador Real-Time PCR 7900 HT Fast System	38
<b>Figura 8.</b> Gráficas obtenidas con el programa informático SDS	39
<b>Tabla 9.</b> Cebadores empleados para realizar las reacciones de amplificación de la región circundante a los SNP R334Q y R334W del gen CARD15	40
<b>Tabla 10.</b> Condiciones de la PCR realizada en el termociclador 2720 Applied Biosystems	41
<b>Tabla 11.</b> Componentes empleados para la elaboración de un gel de acrilamida al 10%	41
<b>Tabla 12.</b> Controles y pacientes secuenciados en los exones estudiados del gen CARD15	45

<b>Figura 9.</b> Cromatogramas del exón 2	46
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas de fragmento 4A del exón 4	47
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas de fragmento 4C del exón 4	47
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas de fragmento 4D del exón 4	48
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas del exón 7	49
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas del exón 8	49
<b>Figura 15.</b> Región intrónica adyacente al extremo 5' del exón 10	50
<b>Figura 16.</b> Cromatogramas del exón 11	51
<b>Tabla 13.</b> Resultados obtenidos para los polimorfismos estudiados en el grupo de pacientes con uveítis idiopática y en los diferentes subconjuntos del mismo	53
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas de las regiones 5' y 3' adyacentes al exón 11	54
<b>Tabla 14.</b> Controles y pacientes empleados para estudiar los polimorfismos asociados a susceptibilidad a padecer SB	55
<b>Figura 18.</b> Resultados de la PCR- RFLP para la posición 334 y cromatogramas de los pacientes correspondientes	56
<b>Tabla 15.</b> Resultados obtenidos para los polimorfismos estudiados en el grupo de pacientes con uveítis infecciosa	58
<b>Figura 19.</b> Recta patrón	60
<b>Tabla 17.</b> Unidades relativas de cada individuo control y de cada paciente con uveítis	61
<b>Figura 20.</b> Western blot de un individuo control y de un paciente con uveítis	61



## **ABREVIATURAS**

<b>A</b>	Adenina
<b>ABC</b>	ATP-binding cassette
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APC</b>	Antigen-presenting cell
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Apaf-1</b>	Apoptotic protease activating factor 1
<b>AR</b>	Artritis reumatoide
<b>BS</b>	Blau syndrome
<b>C</b>	Citosina
<b>C.I</b>	Confidence interval
<b>CARD</b>	Caspase recruitment domain
<b>CARDIAK</b>	Receptor-Interacting Serine-Threonine Kinase 2
<b>CD</b>	Crohn disease
<b>Ced 4</b>	cell-death 4
<b>CG</b>	Cáncer gástrico
<b>CIB</b>	Centro de Investigaciones Biológicas
<b>CLAN</b>	Caspase-associated recruitment domain, leucine-rich repeat, and NACHT-containing protein
<b>CRYAA</b>	$\alpha$ -cristalina recombinante humana
<b>DAMPs</b>	Danger- associated molecular patterns
<b>dNTPs</b>	Deoxyribo-nucleosidetriphosphates
<b>dTT</b>	Dithiothreitol
<b>EC</b>	Enfermedad de Crohn
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminetetraacético/ Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated protein kinase
<b>f</b>	Frecuencia alélica
<b>FRET</b>	Förster resonance energy transfer
<b>G</b>	Guanina
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
<b>GRIM-19</b>	Gene associated with retinoid-IFN-induced mortality 19
<b>HIV</b>	Human immunodeficiency virus
<b>HLA-B27</b>	Human leukocyte antigen
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub></b>	Agua destilada autoclavada
<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>HUPA</b>	Hospital Universitario Príncipe de Asturias
<b>IBD</b>	Inflammatory Bowel Disease
<b>ICE</b>	Interleukine 1 beta Converting Enzyme
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	Inhibitor of kappa B
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B kinase
<b>IL-1</b>	Interleuquina 1
<b>IL-8</b>	Interleuquina 8
<b>IL-10</b>	Interleuquina 10
<b>IL-12</b>	Interleuquina 12
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 beta

<b>IUSG</b>	International Uveitis Study Group
<b>JRSGC</b>	Japanese Society for Research of Gastric Cancer
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistémico
<b>LRR</b>	Leucine-rich-repeat
<b>MALT</b>	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein (MAP) kinases
<b>MAPKK</b>	Kinase of MAPK
<b>MDP</b>	Muramyl dipeptide
<b>MGB</b>	Minor groove binder
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>MTP</b>	Muramyl tripeptide
<b>NaOH</b>	Hidróxido sódico /Sodium hydroxide
<b>NBD</b>	Nucleotide binding domain
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NEMO</b>	NF- $\kappa$ B essential modulator
<b>NFQ</b>	Non-fluorescent quencher
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear kappa B
<b>NLR</b>	NOD-like receptor
<b>NOD</b>	Nucleotid oligomerization domain
<b>Nod1</b>	Nucleotid oligomerization domain 1
<b>Nod2</b>	Nucleotid oligomerization domain 2
<b>O.R</b>	Odd ratio
<b>PAMPs</b>	Pathogen-associated molecular patterns
<b>pANCA</b>	Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa/ Polymerase chain reaction
<b>PCR-RFLP</b>	Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>PGN</b>	Peptidoglycan
<b>PRRs</b>	Pattern-recognition receptors
<b>R</b>	Resistencia
<b>RICK</b>	Receptor interacting protein-like interacting CLARP (caspase-like apoptosis regulatory protein) kinase
<b>RIP-2</b>	Receptor-interacting proteína 2
<b>SDS</b>	Sequence Detection Software
<b>SLE</b>	Systemic Lupus Erythematosus
<b>SNP</b>	Single nucleotide polimorfism
<b>SUN</b>	Standardization of Uveitis Nomenclature
<b>T</b>	Timina
<b>Tak1</b>	TGF-beta activated kinase 1
<b>TAE</b>	Tris acetate EDTA buffer
<b>TBE</b>	Tris-borate-EDTA
<b>TBS</b>	Tris Buffered Saline
<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>TE</b>	Tris HCl EDTA buffer
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
<b>T<sub>H</sub>1</b>	T Helper 1
<b>TINU</b>	Tubulointerstitial nephritis and uveitis

<b>TLRs</b>	Toll-like receptors
<b>T<sub>m</sub></b>	Melting temperature
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor-alpha
<b>UA</b>	Uveítis anterior
<b>UC</b>	Ulcerative colitis
<b>UCM</b>	Universidad Complutense de Madrid
<b>UI</b>	Uveítis intermedia
<b>UICC</b>	International Union Against Cancer
<b>Uif</b>	Uveítis infecciosa
<b>UP</b>	Uveítis posterior
<b>UR</b>	Unidades relativas
<b>UTR-3'</b>	Three prime untranslated region
<b>UTR-5'</b>	Five prime untranslated region
<b>WD40</b>	Triptófano-ácido aspártico 40
<b>WMW</b>	Patrón de peso molecular

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 GEN CARD15 Y PROTEÍNA Nod2

La defensa del huésped frente a infecciones microbianas, está mediada por una variedad de mecanismos efectores que pueden englobarse dentro de dos categorías: defensa inmune innata o defensa inmune adquirida (Medzhitov, 2004; Franchi et al., 2008).

La inmunidad innata juega un papel fundamental en la defensa del huésped, gracias a su habilidad para responder rápidamente a patógenos. Esta capacidad para iniciar respuestas inflamatorias, es atribuida a la presencia de unos receptores, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, pattern-recognition receptors). Los PRRs reconocen motivos microbianos altamente conservados, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns), y señales de peligro endógenas (DAMPs, danger-associated molecular patterns). Los genes que codifican para estos receptores no sufren reordenamientos y un número limitado de PRRs codificados en línea germinal puede detectar prácticamente cualquier infección microbiana (Medzhitov, 2004; Franchi et al., 2008; Rosenzweig et al., 2008).

Los PRRs pueden encontrarse en el espacio extracelular, integrados en las membranas celulares o en el citosol. Dentro de los PRRs unidos a membrana, ya sea en la superficie celular o en el interior de endosomas, los más conocidos pertenecen a la familia de receptores de tipo toll (TLRs, toll-like receptors), que representan la mayor parte de los PRRs, y reconocen gran variedad de ligandos microbianos. Por otro lado, los PRRs citoplásmicos incluyen a helicasas con dominio de reclutamiento de caspasas (CARD, caspase-recruiting domain) y a la familia de los receptores de tipo NOD (NLR, NOD-like receptor). Esta familia, juega un papel importante en la detección de productos bacterianos y, en humanos,

está compuesta por 23 proteínas citosólicas caracterizadas por la presencia de un dominio NOD (nucleotide oligomerization domain) conservado y repeticiones ricas en leucina (LRRs, leucine-rich-repeat) (Franchi et al., 2008; Rosenzweig et al., 2008).

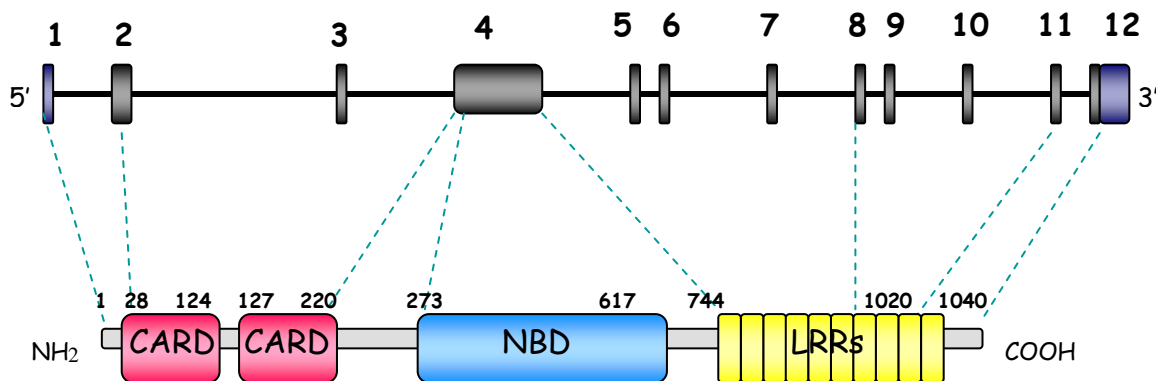
Las proteínas citosólicas NLR, además de estar implicadas en el reconocimiento intracelular de componentes bacterianos PAMPs y en la inducción de una cascada de transducción de la señal específica, que genera una respuesta transcripcional contra las bacterias; participan también en la regulación de mecanismos de apoptosis y en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) (Inohara et al., 2003; Henckaerts & Vermeire, 2007).

La familia de proteínas estructurales intracelulares NLR, incluye a Ced4 (cell-death 4), del helminto *Caenorhabditis elegans* y Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1, CARD12), como los miembros fundadores. Algunos de los miembros de esta familia, tales como la proteína Nod1 (nucleotide oligomerization domain), codificada por el gen CARD4 (caspase recruitment domain), y Nod2, codificada por el gen CARD15, muestran también homología con las proteínas R (de resistencia) de las plantas, implicadas en la defensa frente a patógenos y en mecanismos de muerte celular programada (Inohara, Ogura, & Nunez, 2002; Leung et al., 2007).

Nod1, se identificó inicialmente como una proteína con homología estructural con Apaf-1, de la que se diferenciaba por poseer un dominio rico en leucinas LRR (leucine rich repeats) en su extremo carboxilo terminal, mientras que Apaf-1 estaba formado por repeticiones WD40 (triptófano-ácido aspártico) en ese extremo de la molécula (Tanabe et al., 2004). Más recientemente se identificó un gen altamente homólogo a CARD4, denominado CARD15 (antes conocido como NOD2) (Inohara et al., 2002). Éste último se encuentra en la región pericentromérica del brazo

largo del cromosoma 16 (16q12-q21) (McGovern et al., 2001) y consta de 12 exones que codifican para la proteína citosólica, de 1040 aminoácidos, denominada Nod2 (Miceli-Richard et al., 2001; van Duist et al., 2005; Abraham & Cho, 2006), implicada en la detección intracelular de componentes bacterianos, básicamente muramildipéptido (MDP, muramyl dipeptide). Esta proteína consta de tres tipos de dominios estructurales funcionales, que aparecen representados en la figura 1 (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001).

Conviene aclarar que de los 12 exones de que consta el gen CARD15, el exón 1 corresponde a la región 5' no traducida (UTR-5', five prime untranslated region). Por ello, algunos autores no consideran dicho exón para ciertos estudios génicos, y sólo consideran los exones traducidos a proteína de CARD15, que van del 2 al 12 (Lesage et al., 2002).



**Figura 1.** Modelo de los distintos dominios (CARD, NOD y LRR) de la proteína Nod2 y su correlación con los doce exones del gen CARD15. Nod2 es la primera proteína de la que se sabe que posee dos dominios CARD (McGovern et al., 2001). El gen consta de 39 Kb y codifica para una proteína de 1040 aminoácidos (Abraham & Cho, 2006).

El extremo amino terminal de Nod2 contiene dos dominios efectores CARDS, por lo que probablemente la proteína esté implicada en la regulación de la apoptosis, ya que las caspasas son proteínas intracelulares implicadas en mecanismos de apoptosis o de muerte celular

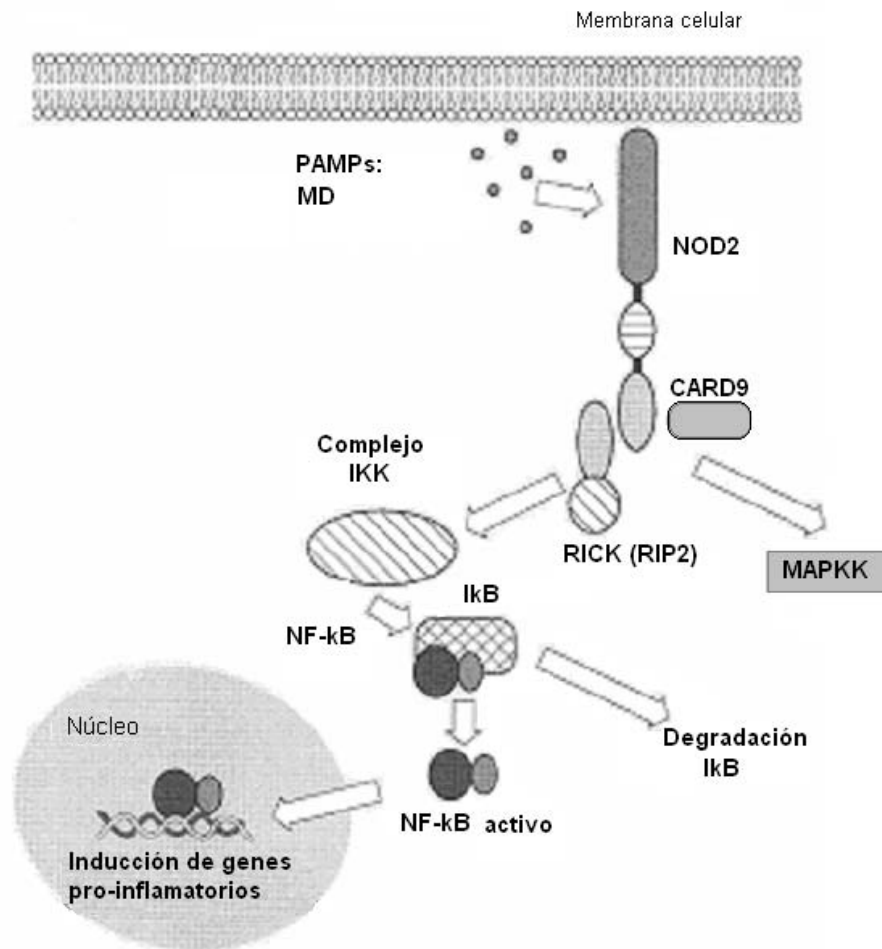


programada. Estos dominios CARD de Nod2 son también requeridos para la activación del factor NF- $\kappa$ B, que juega un papel importante en la respuesta inflamatoria, por lo que están implicados en la ruta de señalización. La activación de este factor parece ser dependiente de la interacción de Nod2, mediante un dominio CARD, con el dominio CARD de la quinasa RIP-2 (receptor-interacting protein-2), también denominada RIP-like interacting CLARP kinase (RICK) y CARD-containing-ICE-associated kinase (CARDIAK). Por otra parte, RIP-2 participa en señalización a través de los receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLR) y del receptor de la célula T (TCR), y está presente tanto en las respuestas inmune innatas como adquiridas (Inohara et al., 2002).

El dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD), también llamado nuclear binding domain (NBD), contiene un cassette de unión a ATP (ABC, ATP-binding cassette) y posee actividad ATPasa (Strober et al., 2006). Esta región permite también la formación de homodímeros (auto-oligomerización) necesarios para la auto-activación (Russell, Wilson, & Satsangi, 2004), hecho que parece facilitar la interacción con RIP-2, con lo que posee una función reguladora. Media también una hetero-oligomerización, así proteínas que contienen dominios NBD pueden interactuar unas con otras, de manera que se crea una red de proteínas que modulan respuestas a patógenos (Leung et al., 2007).

Por último, el extremo carboxilo terminal de Nod2 contiene un dominio de 10 repeticiones ricas en leucinas (LRR) dispuestas en tándem, mediante el cual reconoce productos patogénicos. Estas secuencias aminoacídicas ricas en leucinas, darán lugar a las conformaciones en hélice  $\alpha$  y lámina  $\beta$  necesarias para formar una estructura en forma de bucle. Puesto que las regiones ricas en leucina se repiten en tándem, se formarán diferentes bucles péptidicos dispuestos también en tándem, que juntos darán lugar a una estructura en solenoide (Tanabe et al., 2004; Strober et al., 2006). En concreto, se ha demostrado que la estructura de la bacteria reconocida por

estas LRR es muramil dipéptido (MDP) y muramil tripéptido (MTP) que son productos resultantes de la ruptura del peptidoglicano (PGN), un componente de la pared bacteriana, tanto de bacterias gram negativas como gram positivas (Inohara et al., 2003; Abraham & Cho, 2006; Rosenzweig et al., 2008).



**Figura 2. Señalización de Nod2.** Tras el reconocimiento del muramil dipéptido (MDP) a través del dominio LRR, Nod2 contacta en el interior celular con RICK mediante interacciones CARD-CARD. La activación de RICK lleva a la poliubiquitinación de IKK $\gamma$  del complejo IKK y se fosforila IKK $\beta$ , lo cual provoca una fosforilación del inhibidor de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) que se separa de NF- $\kappa$ B, llevando a su activación. NF- $\kappa$ B entonces se transloca al núcleo, donde favorece la transcripción de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias. Por otra parte, Nod2 puede llevar a la activación de la ruta de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que en último lugar llevará a la activación de p38MAPK y de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK) (Strober et al., 2006)(modificado de Bonen DK

et al. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124(2):530) (Bonen & Cho, 2003) .

No se ha demostrado, sin embargo, si la capacidad de detección bacteriana por parte del dominio LRR, es directa o indirecta, pues no se ha demostrado que LRR se asocie directamente con MDP (Abraham & Cho, 2006). Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que deleciones en el dominio LRR de Nod2 y otras proteínas similares, favorecen la capacidad de formar homodímeros y produce un incremento en la capacidad de señalización intracelular, lo que sugiere que esta región tiene también una función reguladora (Strober et al., 2006).

### 1.1.1 RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE Nod2

La estimulación de Nod2 activa dos rutas de señalización: la ruta de las map quinasas (MAPK) y la ruta de NF- $\kappa$ B, que regulan la transcripción de gran número de genes (figura 2) (Abraham & Cho, 2006).

La activación de Nod2 por parte de sus ligandos, genera un reclutamiento de Nod2 hacia la membrana. También se piensa que esta activación de Nod2, induce un cambio conformacional en la proteína que a su vez permite una asociación de Nod2 a otras proteínas, como son RIP2, Tak1, CLAN (CARD12), procaspasa1, Erbina y GRIM-19. La asociación de Nod2 con RIP2 (a través de los dominios CARD) y con GRIM-19, contribuye a la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de NOD2; mientras que la Erbina y CLAN, regulan negativamente esta activación. Tras la asociación de Nod2 con RIP2, ésta última induce la poliubiquitinación de NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) también conocido como quinasa del inhibidor de NF- $\kappa$ B (IKK $\gamma$ , I $\kappa$ B kinase). Esta proteína constituye la subunidad reguladora del complejo IKK que, a su vez, está constituido por otras dos subunidades catalíticas (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) . La poliubiquitinación IKK $\gamma$  en la lisina 63 (K63), propicia la fosforilación de IKK $\beta$ , que a su vez induce la fosforilación del inhibidor de NF -  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) y

este evento de fosforilación lleva a la disociación de I $\kappa$ B del NF- $\kappa$ B, y a su degradación por el proteasoma, mientras que, por otro lado, NF- $\kappa$ B (p50 y p65) se transloca al núcleo y promueve la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias ( algunas de las más importantes IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10) y defensinas ( $\alpha$ -defensinas 5 y 6) (Abraham & Cho, 2006; Strober et al., 2006) .

### 1.1.2 EXPRESIÓN DE Nod2

Inicialmente se pensaba que el gen CARD15 sólo se expresaba en monocitos, pero recientemente se ha demostrado que se expresa en monocitos, granulocitos, células dendríticas (siendo estos tres los componentes principales de los granulomas del Síndrome de Blau, ver más adelante), astrocitos, osteoblastos, macrófagos y células epiteliales intestinales, entre las que se encuentran las células de Paneth en el intestino delgado. Así mismo, se expresa en miofibroblastos intestinales y células endoteliales (Russell et al., 2004; van Duist et al., 2005; Leung et al., 2007).

## 1.2. MUTACIONES EN CARD15 Y SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD

### 1.2.1 ENFERMEDAD DE CROHN

La enfermedad de Crohn (EC), es una enfermedad inflamatoria que puede afectar a cualquier segmento del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, y en ella pueden verse implicadas la mucosa y capas más profundas de la pared del tubo digestivo (Lesage et al., 2002). En la enfermedad hay una respuesta intensa frente a los componentes de la microflora de la mucosa (en lugar de producirse una respuesta específica frente a organismos patógenos) lo que da lugar a una situación inflamatoria mediada por células T<sub>H</sub>1 (T helper 1) (Strober et al., 2006).

El gen CARD15 se encuentra en la región pericéntrica del cromosoma 16, dentro de lo que históricamente se ha conocido como el locus IBD1 (Inflammatory Bowel Disease), previamente asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) (Hugot et al., 1996). Hasta el momento, este gen es el que ha mostrado una mayor influencia en la susceptibilidad a padecer EC no así colitis ulcerosa, (UC, ulcerative colitis); aunque también se han descrito mutaciones en este gen asociadas con susceptibilidad a padecer otras enfermedades inflamatorias aparte de EC.

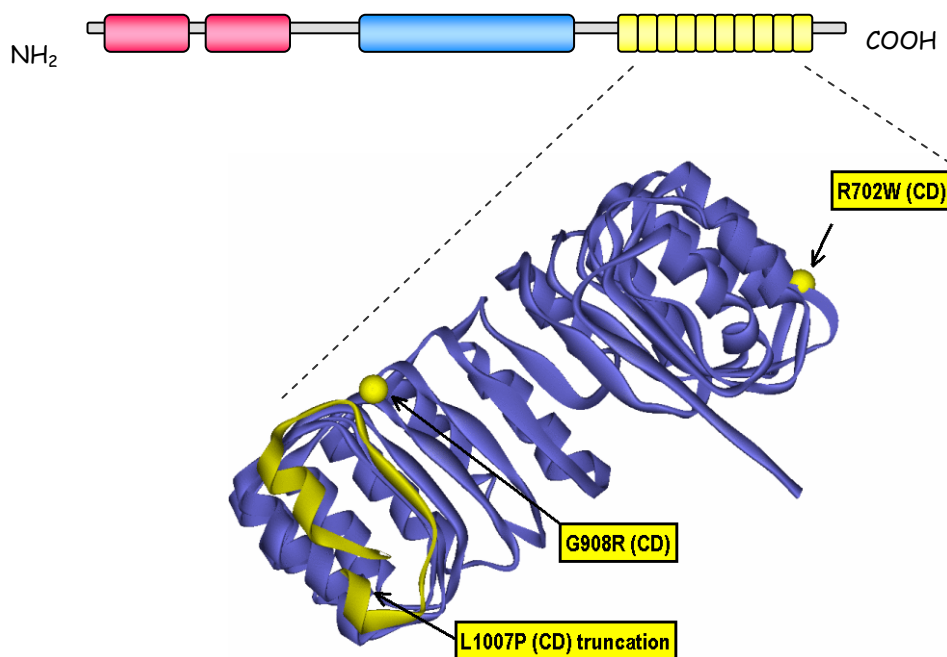
En diversas poblaciones se han descrito tres mutaciones asociadas a susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn y en ellas están implicados aminoácidos localizados dentro del dominio LRR de Nod2. Estas son una transición de citosina a timina (C/T) en el nucleótido 2104 responsable del polimorfismo R702W, donde una arginina es reemplazada por un triptófano (el número de acceso de este polimorfismo, de acuerdo con la base de datos del NCBI, es rs17860491), una transversión de guanina por citosina (G/C) en la posición 2722, que causa el polimorfismo G908R, donde una glicina es sustituida por una arginina (número de acceso rs2066845) y una inserción de una citosina en la posición 3020 (3020*insC*) de la secuencia codificante, que causa un corrimiento en el marco de lectura que lleva a la aparición de un codón stop prematuro en el aminoácido 1007 (L1007fsinsC, rs5743293). Estas mutaciones se sitúan en los exones 4, 8 y 11 respectivamente, con lo que las dos últimas se localizan dentro del dominio LRR de la molécula (ver figura 3) (Hugot et al., 2001; Inohara et al., 2002).

Se ha descrito una mutación adicional asociada también a susceptibilidad a padecer EC, que se encuentra en fase con las tres mutaciones anteriormente mencionadas (ver figura 4). La mutación en cuestión consiste en un cambio de una prolina por serina en el aminoácido 268 (P268S, rs2066842) (Hugot et al., 2001). Por otro lado, se han descrito diferencias geográficas en cuanto a la frecuencia de estas variaciones. Por

ejemplo, son menos frecuentes o incluso no existen en poblaciones afroamericanas (Bonen & Cho, 2003), chinas (Guo et al., 2004) o japonesas (Inoue et al., 2002) y su prevalencia es también baja en países del norte de Europa (Torkvist et al., 2006). Sin embargo, aproximadamente el 40% de los pacientes de Europa occidental y Norteamérica son portadores de, al menos, una de las tres variantes asociadas a la enfermedad (R702W, G908R, L1007fsinsC) (Henckaerts & Vermeire, 2007).

#### 1.2.1.1 MUTACIONES EN Nod2 Y APARICIÓN DE EC

Los individuos heterocigotos para una de las variantes anteriores, tienen entre 2 y 4 veces más riesgo de desarrollar EC. Este riesgo es 20 veces mayor si son homocigotos o heterocigotos complejos (Henckaerts & Vermeire, 2007). No obstante, según propone Hugot (Hugot et al., 2001), estos tres polimorfismos no son suficientes para explicar toda la susceptibilidad a padecer enfermedad atribuida a la región 16q12, con lo que otros polimorfismos, o incluso otros genes en esta región, podrían predisponer a EC. De hecho, se conocen otros loci asociados con EC: en el cromosoma 6 (IBD3), en el 12 (IBD2) y en el 14 (IBD4), y hay autores que sugieren que estas áreas pueden contener genes implicados en la ruta de señalización de Nod2 y también sugieren que un defecto sólo en CARD15 podría no ser suficiente para el desarrollo de EC y podría ser necesaria la interacción con otros genes (McGovern et al., 2001).



**Figura 3.** Localización en el dominio LRR de la proteína Nod2 de las tres variantes asociadas a EC. Modificado de <http://medbioinf.mpi-inf.mpg.de/projects/disease.php>.

No está claro todavía si las mutaciones de CARD15 asociadas a EC llevan a una pérdida o ganancia de función en el receptor Nod2 (Henckaerts & Vermeire, 2007). Si bien no se conocen los mecanismos por los que estos defectos aumentan la susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn, se ha propuesto que impiden el reconocimiento del MDP de las bacterias, que a largo plazo, puede llevar a una respuesta inflamatoria anormal hacia patógenos y promueven inflamación intestinal (Li et al., 2004). Se han postulado tres hipótesis para explicar este hecho:

#### 1) Defensa epitelial defectuosa.

En células de Paneth que expresan Nod2 sin mutar, la defensa frente a bacterias entéricas se lleva a cabo por liberación de  $\alpha$ -defensinas. Cuando estas células expresan las variantes de Nod2, falla este mecanismo de defensa porque no se produce la activación de NF- $\kappa$ B, disminuye la expresión de defensinas, aumenta la carga bacteriana y como consecuencia, se produce inflamación (Eckmann & Karin, 2005) (ver figura 4).

## **2) Disregulación en la síntesis de IL-12.**

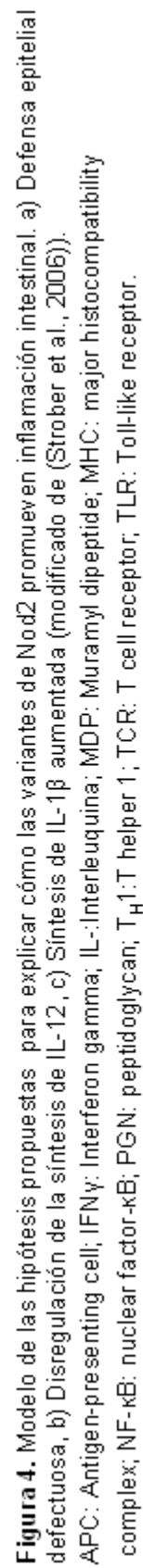
La proteína Nod2 nativa limita la respuesta de los macrófagos a peptidoglicanos mediada por TLR2, mientras que las variantes no oponen limitación, aumentan la expresión ARNm (ácido ribonucleico mensajero) que codifica para la IL-12p35 (interleuquina 12p35), aumentan los niveles de IL-12 y se produce diferenciación hacia una respuesta  $T_H1$ , generándose, como consecuencia, inflamación (Eckmann & Karin, 2005)(ver figura 4).

Por otro lado, otros estudios de respuestas de citoquinas en pacientes con CARD15 mutado, revelan que tienen una respuesta reducida de citoquinas frente a peptidoglicano o frente a varios ligandos de TLRs en presencia de muramildipéptido, por lo que la señalización a través de Nod2 mediada por el muramildipéptido, podría aumentar las respuestas de los TLRs en individuos normales en lugar de inhibirla (Strober et al., 2006).

## **3) Aumento de la síntesis de IL-1 $\beta$ .**

La tercera hipótesis propone que las variantes de Nod2 inducen una mayor síntesis de IL-1 $\beta$ , ya que activan a la caspasa 1, también denominada ICE (Interleukine 1 beta Converting Enzyme) que cataliza el paso de proIL-1 $\beta$  a IL-1 $\beta$ , lo que contribuye a la inflamación. Por otra parte, estas variantes también activan más eficazmente la quinasa RIP2, que activa a NF- $\kappa$ B, induciendo en última instancia inflamación intestinal (Eckmann & Karin, 2005) (ver figura 4).





### 1.2.2 SÍNDROME DE BLAU

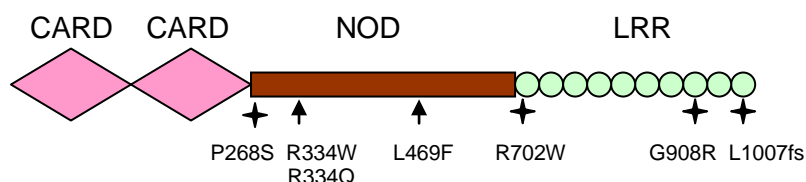
El síndrome de Blau (SB MIM#186580) es un desorden inflamatorio crónico poco frecuente que se caracteriza por una granulomatosis de inicio temprano, artritis sistémica crónica, erupción cutánea (Becker & Rose, 2005) camptodactilia, neuropatía craneal y uveítis recurrente (relevante para el presente trabajo). Es un síndrome con un patrón de herencia mendeliana autosómica dominante (Miceli-Richard et al., 2001; Strober et al., 2006) y cabe destacar, que las manifestaciones inflamatorias de SB afectan a múltiples órganos y tejidos que expresan el gen CARD15, sin una dependencia aparente de un estímulo intestinal (van Duist et al., 2005).

Se han descrito mutaciones en el dominio NOD de la proteína Nod2 en esta patología (Strober et al., 2006). Las variantes de CARD15 son: una transición de C por T en el nucleótido 1002, responsable del polimorfismo R334W, en el que una arginina es sustituida por un triptófano; una transversión de G por A en la posición 1003, que lleva a una sustitución del aminoácido 334, que es una arginina, por una glutamina (R334Q) y el cambio en el nucleótido 1409 de una C por una T, que da lugar al SNP L469F, en el que una leucina es sustituida por una fenilalanina. Recientemente se ha asociado un nuevo polimorfismo con SB, una sustitución de ácido glutámico por lisina (E383K). El cambio fue detectado en una familia italiana con SB y el ácido glutámico sustituido se encuentra próximo a un motivo de unión a  $Mg^{2+}$  (Walker B). El polimorfismo es consecuencia de una sustitución de G por A en el nucleótido 1147 (van Duist et al., 2005).

Las mutaciones en este dominio pueden hacer decrecer el umbral para la oligomerización espontánea de Nod2. Son, por tanto, mutaciones con ganancia de función que dan lugar a una excesiva señalización por parte de Nod2, que es independiente de la presencia de MDP. Por esta razón, células que expresen estas formas mutadas de Nod2, muestran un aumento en la activación de NF- $\kappa$ B, incluso en ausencia de estimulación con MDP

(en contraposición con los polimorfismos asociados a susceptibilidad a padecer EC, que tradicionalmente se han asociado con una pérdida de función, ver página 17) (Strober et al., 2006). Sin embargo, todavía se desconoce cómo las mutaciones en este dominio pueden afectar a la detección de patógenos (Ahmad et al., 2005)).

Un hecho destacable, es la distinta localización de los SNPs asociados a susceptibilidad a padecer EC, con respecto a los asociados a susceptibilidad a padecer SB (ver figura 5).



**Figura 5.** En la figura se muestra la diferente localización de los polimorfismos asociados a susceptibilidad a padecer Síndrome de Blau (↑), situados en el dominio NOD y los asociados a susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn (⇑), la mayoría de los cuales se encuentran en el dominio LRR.

Cabe destacar que también se han descrito mutaciones de CARD15 en otra patología que también cursa, como EC y SB, con granulomas: la sarcoidosis de inicio temprano. Esto sugiere la implicación de este gen en el desarrollo de enfermedades granulomatosas, posiblemente debido a una activación inapropiada del sistema inmune. Datos de diversos estudios muestran que esta activación inapropiada puede incluso llevar a la proliferación incontrolada de ciertos tipos celulares (Henckaerts & Vermeire, 2007).

La uveítis, además de ser un síntoma del síndrome de Blau, se presenta más frecuentemente cómo una patología independiente de Blau y a grandes rasgos, puede ser idiopática o infecciosa, ésta última es causada por respuestas inmunes contra patógenos exógenos presentes en el ojo (bacterias, citomegalovirus, hongos, *Toxoplasma gondii*, ...). En cualquier

caso, es una enfermedad inflamatoria intraocular y una de las mayores causas de trastorno visual (Doycheva et al., 2007).

### 1.2.3 UVEÍTIS

La uveítis, sensu stricto, es una inflamación del tracto uveal. La úvea es la encargada de aportar la mayor parte del suministro sanguíneo a la retina. Esta capa intermedia del ojo, se encuentra entre la esclera, la conjuntiva y la cámara anterior en su parte externa y la retina en su interior (Munoz-Fernandez & Martin-Mola, 2006). En la uveítis se produce una inflamación ocular, con grandes cantidades de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) expresado localmente en el humor acuoso y en una menor medida interleuquina 10 (IL-10) (Takase et al., 2006). De hecho, la inflamación ocular asociada a la infección, tiende a producir, en el caso de las uveítis infecciosas, más daño tisular que la infección inicial en sí y puede desencadenar finalmente dificultad visual e incluso ceguera (Falappone et al., 2004). En esta enfermedad, hay una sobreactivación del sistema inmune que se manifiesta de distintas formas. Su rasgo más característico es la infiltración de leucocitos de los tejidos de la úvea, y presenta respuestas inmunes mediadas por los linfocitos T<sub>H</sub>1 (Abu El-Asrar et al., 2004).

Aunque la definición estricta de uveítis sea la inflamación del tracto uveal, actualmente el término se emplea también para describir diversas formas de inflamación intraocular que pueden afectar no sólo a la úvea sino también las estructuras adyacentes (Kanski, 1992).

La incidencia anual de esta enfermedad en países occidentales es de aproximadamente 17/100000 y la prevalencia es de 38/100000 (Smit, Baarsma, & de Vries, 1993).

### 1.2.3.1 TRATAMIENTO

Los corticosteroides han sido el principal tratamiento para la enfermedad inflamatoria ocular. Pueden ser administrados por vía tópica, como inyecciones perioculares o por vía sistémica (oral, intramuscular o intravenosa), para tratar la inflamación ocular (Kurokawa et al., 2003). Sin embargo, en algunos pacientes los corticosteroides sistémicos son insuficientes para el control de la enfermedad o desarrollan efectos secundarios no tolerables, por lo que es necesario el tratamiento con inmunosupresores. Las drogas inmunosupresoras, pueden ser antimetabolitos (metotrexato, azatioprina, micofenolato mofetil), inhibidores de células T (ciclosporina A, tacrolimus) y agentes alquilantes (ciclofosfamida y clorambucil) (Jabs et al., 2000).

Los agentes biológicos son una nueva clase de drogas que suprimen la cascada inflamatoria al inhibir mediadores proinflamatorios específicos del sistema inmune: como linfocitos (rituximab), citocinas proinflamatorias o sus receptores (Jabs et al., 2000). En el caso de los inhibidores de citocinas, son muy utilizados los inhibidores del  $\text{TNF}\alpha$  (tumor necrosis factor alpha), puesto que son un tratamiento efectivo frente a las uveítis refractarias; en concreto se emplean el infliximab (anticuerpo monoclonal anti- $\text{TNF}\alpha$ ) y el etanercept (proteína de fusión Fc-p75 que actúa como receptor del  $\text{TNF}\alpha$ ) , con ellos disminuye el riesgo de recaídas y han demostrado ser un tratamiento efectivo y seguro en el tratamiento de uveítis asociadas a enfermedades reumáticas (Falappone et al., 2004; Michalova & Lim, 2008). Por último, en el caso de inhibidores de receptores de citocinas, es muy empleado el daclizumab, que es un antirreceptor de interleuquina 2 (IL-2)(Jabs et al., 2000; Michalova & Lim, 2008).

### 1.2.3.2 PATOGENIA Y CLASIFICACIÓN

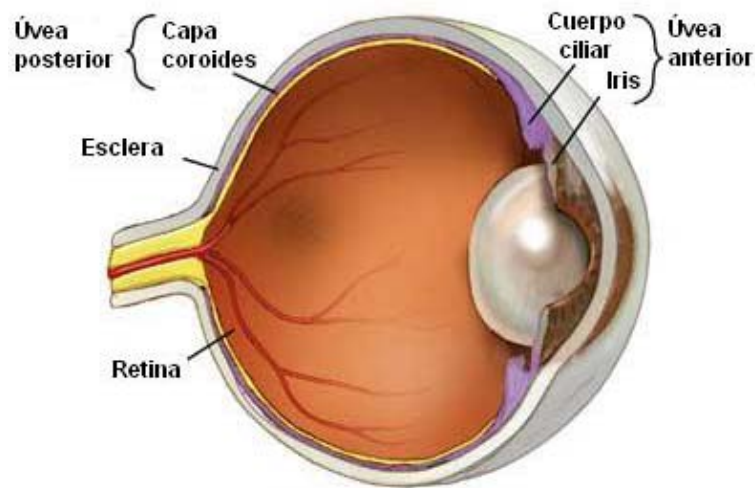
Si bien la clasificación más ampliamente utilizada es la establecida en 1987 por el grupo Internacional de estudio de las uveítis (IUSG,

International Uveitis Study Group), basada en la localización anatómica de la inflamación. También se han realizado diversas clasificaciones de uveítis de acuerdo a criterios clínicos, etiológicos y anatomopatológicos (Jabs et al., 2005).

#### CLASIFICACIÓN ANATÓMICA

Según este tipo de clasificación, la uveítis puede ser anterior, intermedia, posterior o difusa (también conocida como panuveítis), dependiendo de la región de la úvea que esté afectada (ver figura 6) (Kanski, 1992).

La forma más común de uveítis es la anterior, en la que el sitio primario de inflamación es la cámara anterior. Este tipo de uveítis se subdivide en iritis (cuando la inflamación afecta al iris), iridociclitis (la afectación ocurre por igual tanto en iris como en la parte anterior del cuerpo ciliar) y ciclitis anterior. En la uveítis intermedia (pars planitis, ciclitis posterior) el sitio primario de inflamación es el vítreo, por lo que se ven afectados la parte posterior del cuerpo ciliar y la extrema periferia de la retina. La uveítis posterior afecta a la parte posterior del tracto uveal, en ella la inflamación se localiza en la retina o la coroides (o en ambas), así, se subdividirá en focal, multifocal o coroiditis difusa, retinitis, coriorretinitis y neoretinitis. Por último, la uveítis difusa o panuveítis, se caracteriza por la afectación de la totalidad del tracto uveal (cámara anterior, vítreo, retina y coroides) (Kanski, 1992; Jabs et al., 2005).



**Figura 6.** Partes anatómicas de la úvea. En la uveítis anterior, se pueden ver afectados el iris y el cuerpo ciliar; en la uveítis intermedia aparece afectada la porción media del ojo (pars plana, cuerpo ciliar posterior y vítreo), mientras que en la uveítis posterior, hay una inflamación de la coroides y la retina. Modificado de Mayo Foundation for Medical Education and Research.

### CLASIFICACIÓN CLÍNICA

El criterio de clasificación empleado es la forma de comienzo y la duración de las uveítis. Atendiendo a este criterio, las uveítis pueden subdividirse en agudas o crónicas (Kanski, 1992).

La uveítis aguda suele tener un comienzo sintomático brusco y una duración de seis semanas o menor. Cuando la inflamación recurre tras el ataque inicial, se denomina aguda recurrente. Mientras que las uveítis crónicas pueden durar meses o años. Su comienzo tiende a presentarse de manera insidiosa y asintomática, aunque en ocasiones pueden existir exacerbaciones subagudas (Kanski, 1992).

### CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA

Aunque se conoce poco acerca de la etiología de la uveítis, se sabe que en su aparición juegan un papel muy importante tanto los factores genéticos como los ambientales (Martin & Rosenbaum, 2005).

La genética de esta enfermedad permanece desconocida y en ella se han implicado varios genes: el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA-B27), los polimorfismos de genes de citoquinas o los genes de los receptores de quemoquinas (Martin & Rosenbaum, 2005). Poco se conoce de la implicación del gen CARD15 en las uveítis idiopáticas, pero no parece inadecuado pensar que tuviera alguna implicación en las mismas, ya que finalmente es una patología inflamatoria crónica.

Teniendo en cuenta la clasificación etiológica, las uveítis pueden ser exógenas o endógenas (Kanski, 1992). Las uveítis exógenas están causadas por una agresión externa a la úvea o por la invasión de microorganismos u otros agentes desde el exterior. Mientras que las uveítis endógenas, están causadas por microorganismos u otros agentes procedentes del propio paciente. Éstas últimas, suelen presentar un mejor pronóstico que las uveítis exógenas y están sujetas a su vez a una subclasificación (Kanski, 1992).

Subtipos de uveítis endógenas:

- Secundarias a enfermedad sistémica, enfermedades inflamatorias o autoinmunes sistémicas, como la enfermedad intestinal inflamatoria (Ghanchi & Rembacken, 2003).
- Debidas a infecciones por parásitos, como *Toxoplasma gondii*.
- Causadas por infecciones virales (citomegalovirus).
- Causadas por infecciones por hongos (candidiasis).
- Uveítis idiopáticas específicas, que no se encuentran asociadas a ninguna enfermedad sistemática subyacente y tienen características especiales por sí mismas para justificar una descripción por separado, por ejemplo, *pars planitis*.
- Uveítis idiopáticas no específicas, que no pueden clasificarse en ninguna de las categorías anteriores y que representan el 25% de todos los casos de uveítis (Kanski, 1992).

Conviene destacar, que un rasgo propio de la IBD como es la permeabilidad intestinal alterada, también ha sido descrito en uveítis,



sugiriendo que tanto la mucosa intestinal como su tejido linfoide pueden estar implicados en la patogénesis de la uveítis (Banares et al., 1995).

### CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

Según esta clasificación, las uveítis pueden ser granulomatosas o no granulomatosas, con características diferentes; aunque clínicamente, la separación no es siempre útil, porque algunas formas de uveítis granulomatosas, pueden presentar rasgos no granulomatosos y viceversa (Kanski, 1992).

#### 1.2.3.3 AUTOANTICUERPOS FRENTE A $\alpha$ -CRISTALINA

Las cristalinas constituyen aproximadamente el 90% de las proteínas solubles del cristalino del ojo en vertebrados e incluyen tres grandes familias de proteínas: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) (Dubin et al., 1990). Aunque en concreto, las  $\alpha$ - y  $\beta$ -cristalinas son los componentes mayoritarios del cristalino y contribuyen a su transparencia y su poder refractor. Las  $\alpha$ -cristalinas están compuestas por una subunidad ácida,  $\alpha A$ , y otra básica,  $\alpha B$ , con un peso molecular de 19,9 y 20,1 kDa respectivamente; mientras que existen seis tipos diferentes de  $\beta$ -cristalinas, tres ácidas y tres básicas (Doycheva et al., 2007).

Estudios previos, han puesto de manifiesto la presencia de anticuerpos frente a proteínas del cristalino en el suero de pacientes con uveítis (en población alemana) siendo estos sueros reactivos frente a  $\alpha$ -cristalina (Doycheva et al., 2007). Aunque su importancia clínica permanece todavía sin aclarar y no se sabe si los anticuerpos frente a cristalino tienen una función patogénica o protectora en la uveitogénesis. Se ha propuesto que, podrían ser el resultado del desarrollo de cataratas, frecuentes en la evolución de las uveítis, (aunque en estos casos los anticuerpos están dirigidos principalmente frente a la  $\beta$ - y la  $\gamma$ -cristalina, en lugar de la  $\alpha$ -cristalina (Merck et al., 1993)); o bien podrían aparecer como consecuencia del escape de cristalinas del cristalino (Doycheva et al., 2007).

#### 1.2.4 CÁNCER GÁSTRICO Y CARD15

En diversos trabajos científicos se ha puesto de manifiesto la posible relación de las moléculas Nod1 y Nod2, con la respuesta inflamatoria frente a *Helicobacter pylori in vitro* en pacientes con gastritis crónica, úlcera gástrica y linfoma gástrico MALT. Así, diferentes mutaciones en CARD15, como la variante R702W o una mutación sin sentido en el dominio LRR, se han asociado al desarrollo de linfoma gástrico (lo que ocurre en las células que portan esta variante R702W, según estos estudios, es que la respuesta de NF- $\kappa$ B está disminuida). Por otra parte, se han asociado diferentes SNPs en el cluster de genes de la IL-1 con adenocarcinoma gástrico, tras infección por *H. pylori*. El desenlace clínico viene determinado por un perfil genético de riesgo en estos genes pro- y anti-inflamatorios más que por una única mutación. La mayoría de pacientes con gastritis presentaban una mayor expresión de Nod1 y Nod2 en comparación con los controles, y los pacientes que sufren de linfoma MALT gástrico, son con mayor frecuencia, portadores de los alelos raros de R702W (dicho polimorfismo también es conocido como SNP8), G908R (SNP12) y L1007fsinsC (SNP13) de CARD15 en comparación con pacientes infectados con *H.pylori* sin linfoma (Rosenstiel et al., 2006).

Hasta el momento se creía que *H.pylori* era un patógeno extracelular, y se pensaba que, probablemente, un TLR estaría implicado en el reconocimiento inmune innato de este patógeno. Se ha demostrado, sin embargo, que la expresión de Nod2 por parte de las células epiteliales de la mucosa gástrica permite el reconocimiento intracelular de este patógeno y dicha proteína aumenta su expresión en condiciones de inflamación en estas células. Este dato concuerda con el hecho de que bajos niveles de Nod2 en células epiteliales del intestino colónicas, pueden aumentar su expresión mediante la presencia de citoquinas TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha) e INF- $\gamma$  tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otro lado, Nod2 regula la expresión de péptidos antimicrobianos (defensinas) que han sido

implicadas en la respuesta antibacteriana contra *H.pylori* (Rosenstiel et al., 2006).

La úlcera gástrica y el linfoma MALT son dos patologías distintas dependientes de *H.pylori*. En la úlcera, no se ha encontrado ninguna asociación con los principales polimorfismos codificantes de CARD15, empleando análisis de marcadores únicos. Sin embargo, las variantes de CARD15: R702W, G908R y L1007fsinsC, se encontraron con mayor frecuencia en pacientes con linfoma MALT que en los controles (Rosenstiel et al., 2006). Por tanto, hay una asociación entre estas variantes de CARD15 y la susceptibilidad a padecer linfoma MALT inducido por *H.pylori*. También se sabe que la activación de NF- $\kappa$ B mediada por Nod2 sinergiza con el reconocimiento de *H.pylori* producido por parte de TLR4. Por otro lado, la presencia de la variante SNP8 del gen CARD15 en pacientes, desencadena a una respuesta deficitaria frente a la infección con *H.pylori*, lo que puede llevar a una activación secundaria del sistema inmune implicada en la etiopatogénesis del linfoma gástrico (Rosenstiel et al., 2006).

### 1.3 MODELO MURINO

Los modelos murinos han servido para confirmar el papel de las bacterias entéricas en la patogénesis de EC, porque en ratones modificados genéticamente utilizados como modelos para EC, la enfermedad no se manifestaba en ambientes libres de gérmenes, mientras que se desarrollaba cuando eran expuestos a la flora comensal entérica normal (McGovern et al., 2001). También se ha demostrado que los ratones deficientes en Nod2 carecen de una adecuada expresión intestinal de cryptidina (que es la homóloga en ratón de I $\alpha$  -defensina) y presentan mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas vía oral, como la infección con el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* (Rosenstiel et al., 2006).

Por otro lado, en estudios con ratones CARD15  $-/-$ , se ha observado que hay un descenso en la fosforilación de I $\kappa$ B, p38 y ERK, tras estimulación con MDP (Abraham & Cho, 2006). Sin embargo, no se ha demostrado un cambio

en la expresión del gen CARD15 en modelos de inflamación intestinal (Fujisawa et al., 2006).

Existe también un modelo animal de 'uveítis autoinmune experimental', donde se han descrito varios autoantígenos organoespecíficos, como el antígeno S- retinal y la proteína de unión al interfotorreceptor retinoide. Aunque su diagnóstico y papel patogénico en humanos es bastante discutido, últimamente se ha puesto de manifiesto la relevancia de la  $\beta$  B1-cristalina, encontrada en el cristalino y cuerpo ciliar. La  $\beta$  B1-cristalina es una de las principales proteínas del cristalino y se ha sugerido que puede ser una diana antigénica para anticuerpos citoplásmicos anti-neutrófilos perinucleares (pANCA) asociada con uveítis (Doycheva et al., 2007). Se ha implicado a las proteínas del cristalino en la patogénesis de la inflamación intraocular pero el mecanismo por el cuál están implicadas todavía no se ha aclarado (Doycheva et al., 2007).

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio ha sido analizar los exones que se traducen a proteína del gen CARD15 en un grupo de pacientes con uveítis idiopática e infecciosa en población española y correlacionar las variaciones encontradas en el gen, con las distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad. De este propósito principal de nuestro estudio, se desprenden los siguientes objetivos:

1. Secuenciar los exones traducidos a proteína del gen CARD15 en un grupo limitado de pacientes con uveítis idiopática e individuos control, para determinar la posible presencia de mutaciones no descritas previamente.
2. Determinar las frecuencias alélicas y el porcentaje de presencia de los polimorfismos más característicos asociados a susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn (P268S, R702W, G908R y 1007fs) y síndrome de Blau (R334Q, R334W, L469F) de pacientes con uveítis idiopática e infecciosa en población española y en un grupo control.
3. Estudiar la frecuencia de los polimorfismos asociados a susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn en un grupo de pacientes con adenocarcinoma gástrico, para determinar la posible asociación de CARD15 con esta patología inflamatoria.
4. Determinar la presencia de autoanticuerpos frente a  $\alpha$ -cristalina en suero de pacientes con uveítis, mediante el diseño de una técnica de enzoinmunoensayo (ELISA), utilizando un antígeno recombinante humano, y su optimización.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. SUJETOS EXPERIMENTALES

Los pacientes han sido seleccionados por el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias (HUPA) de Alcalá de Henares. Se ha obtenido consentimiento informado de 122 pacientes españoles con uveítis idiopática no emparentados, que fueron diagnosticados siguiendo criterios estándar (Jabs, Nussenblatt, Rosenbaum, & Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group, 2005). Se han empleado 111 pacientes para el estudio genético; tras su diagnóstico siguen la distribución que se detalla a continuación: 70 pacientes presentaban uveítis anterior, 19 uveítis intermedia y 22 uveítis posterior. Además, 15 de las 111 muestras de sangre obtenidas, corresponden a pacientes con uveítis infecciosa (la tabla 1 muestra las principales características de estos pacientes) (las tablas 2 y 3 resumen estas características). Adicionalmente, se han obtenido sueros pertenecientes a 11 pacientes con uveítis, para el estudio de autoanticuerpos frente a  $\alpha$ -cristalina, seleccionados por el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares (ver tabla 4).

Por otro lado, se han seleccionado muestras de 26 pacientes con adenocarcinoma gástrico procedentes del Servicio de Cirugía General y Digestivo del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares (ver tabla 5), clasificados según el sistema de clasificación de la Japanese Society for Research of Gastric Cancer (JRS GC) (Japanese Gastric Cancer, 1998) o de la International Union Against Cancer (UICC) (Sobin & Fleming, 1997).



Finalmente, se ha dispuesto de muestras de ADN de 105 donantes voluntarios sanos cedidos por el Dr. J. L. Vicario del Centro de Transfusión de la C.A.M, Madrid.

PACIENTE	EDAD (AÑOS)	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
UA1	25	Uveítis anterior aguda bilateral
UA2	41	Uveítis anterior aguda bilateral
UA3	47	Uveítis anterior crónica (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA4	68	Uveítis anterior crónica bilateral
UA5	42	Uveítis anterior aguda
UA6	28	Uveitis anterior aguda bilateral
UA7	42	Uveítis anterior crónica bilateral
CUA8	31	Uveitis anterior aguda bilateral. EC
UA9	60	Uveitis anterior aguda bilateral . Espondiloartropatía
UA10	38	Uveítis anterior crónica bilateral
UA11	72	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA12	25	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA13	29	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA14	33	Uveítis anterior aguda bilateral. Enfermedad de Beçhect
UA15	61	Uveitis anterior aguda. Epondiloartropatía
UA16	60	Uveítis anterior aguda bilateral. Síndrome de TINU
UA17	47	Uveitis anterior aguda unilateral
UA18	33	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
CUA19	51	Uveitis anterior aguda bilateral. Espondilitis anquilopoyética, retinosis pigmentaria, EC
UA20	27	Uveitis anterior aguda bilateral
UA21	43	Uveitis anterior aguda unilateral. Espondilitis anquilopoyética
UA22	46	Uveitis anterior aguda bilateral. Espondilitis aquilopoyética, HLA- B27+
UA23	56	Uveítis anterior aguda unilateral
UA24	76	Uveítis anterior crónica bilateral
UA25	34	Uveítis anterior aguda unilateral
UA26	54	Uveítis anterior aguda unilateral
UA27	46	Uveítis anterior aguda unilateral
UA28	39	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA29	50	Uveítis anterior aguda bilateral. Espondilitis anquilopoyética , HLA-B27+
CUA30	46	Uveitis anterior aguda bilateral. EC
UA31	34	Uveítis anterior aguda unilateral
UA32	26	Uveítis anterior crónica (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA33	34	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA34	52	Uveítis anterior aguda unilateral
UA35	76	Uveítis anterior aguda bilateral
UA36	43	Uveítis anterior aguda bilateral
UA37	48	Uveítis anterior aguda unilateral
UA38	66	Uveítis anterior aguda unilateral
UA39	32	Uveítis anterior aguda bilateral
UA40	40	Uveítis anterior aguda unilateral
UA41	70	Uveítis anterior crónica unilateral
UA42	32	Uveítis anterior aguda bilateral
UA43	41	Uveítis anterior aguda unilateral. Espondilitis anquilopoyética

UA44	56	Uveítis anterior aguda bilateral. Espondilitis anquilopoyetica
UA45	37	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA46	36	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA47	64	Uveítis anterior aguda unilateral
UA48	48	Uveitis anterior aguda unilateral
UA49	24	Uveitis anterior aguda bilateral. HLA-B27+
UA50	31	Uveitis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA51	27	Uveitis anterior aguda unilateral. Síndrome de Posner-Schlossman
UA52	43	Uveitis anterior aguda bilateral. HLA-B27+
UA53	41	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA54	40	Uveítis anterior aguda bilateral. Espondilitis anquilopoyética
UA55	62	Uveítis anterior aguda unilateral
UA56	78	Uveítis anterior crónica unilateral
UA57	21	Uveítis anterior aguda unilateral
UA58	53	Uveítis anterior aguda bilateral. Espondilitis anquilopoyética, HLA-B27+
UA59	49	Uveítis anterior aguda unilateral
UA60	48	Uveítis anterior aguda bilateral
UA61	38	Uveítis anterior crónica unilateral (uveítis heterocrómica de Fuchs)
UA62	34	Uveítis anterior aguda bilateral
UA63	40	Uveítis anterior aguda bilateral. Espondilitis anquilopoyética
UA65	38	Uveítis anterior aguda unilateral
UA66	53	Uveítis anterior aguda
UA64	47	Uveítis anterior aguda bilateral
UA67	45	Uveítis anterior aguda unilateral. Espondilitis anquilopoyética, HLA-B27+
UA68	48	Uveítis anterior aguda unilateral. Espondilitis anquilopoyética
UA69	41	Uveitis anterior aguda unilateral
UA70	56	Uveítis anterior aguda unilateral
UA71	23	Uveítis anterior aguda bilateral
UI1	20	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI2	41	Uveítis intermedia (pars planitis). Espondilitis anquilopoyética
UI3	25	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI4	60	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI5	44	Uveítis intermedia
UI6	22	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI7	24	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI8	46	Uveítis intermedia
UI9	62	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI10	30	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI11	25	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI12	37	Uveítis intermedia
CUI13	34	Uveítis intermedia (pars planitis). EC
UI15	27	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI16	24	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI17	40	Uveítis intermedia (pars planitis)
UI18	30	Uveítis intermedia
UI19	16	Uveítis intermedia (pars planitis)
UP1	34	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP2	57	Uveítis posterior. Enfermedad de Beçhet
UP3	70	Uveítis posterior (vasculitis retiniana). Síndrome de Sjögren
UP4	60	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP5	51	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP6	64	Uveítis posterior
UP7	42	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP8	74	Uveítis posterior (retinocoroidopatía en perdigonazo)

		HLA-A1,29/B44,50/BW4,6/DR7/DRW52,53/DQ2
UP9	55	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP10	24	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP11	78	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP12	57	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP13	34	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP14	34	Uveítis posterior. Enfermedad de Beçhet
UP15	55	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP16	68	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP17	42	Uveítis posterior (vasculitis retiniana). HLA-A29+
UP18	23	Uveítis posterior (corioiditis multifocal)
UP19	74	Uveítis posterior (vasculitis retiniana)
UP20	26	Uveítis posterior (síndrome de puntos blancos evanescentes)
UP21	60	Uveítis posterior (corioidopatía serpiginosa)
UP22	61	Uveítis posterior
UIf1	32	Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)
UIf2	19	Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)
UIf3		Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)
UIf4	27	Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)
UIf5	36	Uveítis posterior toxoplásmica
UIf6	67	Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)
UIf7	27	Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)
UIf8	11	Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)
UIf9	35	Uveítis posterior (necrosis retiniana aguda)
UIf10	38	Uveitis anterior crónica unilateral (herpética)
UIf11	19	Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)
UIf12	47	Uveitis anterior crónica unilateral (herpética)
UIf14	24	Uveítis posterior
UIf15	34	Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)
UIf16	18	Uveítis posterior (retinocoroiditis toxoplásmica)

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes con uveítis idiopática e infecciosa empleados para el estudio de CARD15. EC: enfermedad de Crohn; TINU: Tubulointerstitial nephritis and uveitis.

<b>Pacientes</b>		<b>n=111</b>
<b>Edad (media; rango)</b>		43 años; 16-78 años
<b>Sexo H/M</b>		53/58
<b>Subtipos de uveítis:</b>		
Uveítis anterior		70
Uveítis intermedia		19
Uveítis posterior		22
<b>Condiciones</b>	<b>inflamatorias</b>	<b>sistémicas</b>
<b>concomitantes</b>		
Enfermedad de Crohn		4
Espondiloartropatía		15
Enfermedad de Behcet		3
Otras (LES, AR, etc...)		10
<b>Individuos control</b>		<b>n= 105</b>

**Tabla 2.** Resumen de las características clínicas de los pacientes con uveítis idiopática estudiados. LES: Lupus eritematoso sistémico, AR: Artritis reumatoide.

<b>Pacientes</b>	<b>n=15</b>
<b>Edad (media; rango)</b>	31 años; 11-66 años
<b>Sexo H/M</b>	5/10
<b>Subtipos de uveítis:</b>	
Uveítis anterior	2
Uveítis intermedia	
Uveítis posterior	13
<b>Agente infeccioso:</b>	
<i>Toxoplasma</i>	12
Virus	3

**Tabla 3.** Resumen de las características clínicas de los pacientes con uveítis infecciosas estudiados.

PACIENTES	EDAD (AÑOS)	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
1	39	Uveítis intermedia
2	37	Uveítis anterior aguda ojo izquierdo
3	7	Pars planitis
4	78	Uveítis herpética ojo derecho
5	45	Panuveítis, HIV+
6	57	Uveítis intermedia
7	62	Uveítis anterior aguda ojo derecho
8	37	Uveítis anterior aguda ojo izquierdo
9	25	Uveítis intermedia ojo derecho
10	26	Uveítis intermedia ojo derecho
11	57	Uveítis anterior aguda recurrente ojo derecho

**Tabla 4.** Características clínicas de los pacientes con uveítis idiopática empleados para la obtención de los sueros para detectar autoanticuerpos frente a  $\alpha$ -cristalina.

<b>Pacientes</b>	<b>n=26 (20 vivos)</b>
<b>Edad (media; rango)</b>	69 años; 37-89 años
<b>Sexo H/M</b>	19/7
<b>Enfermedad: libre/persistencia</b>	19/7
<b>Estadío:</b>	
I/ IA/ IB	2/ 1/ 1
II	1
III/ IIIA/ IIIB	7/ 3/ 3
IV	8

**Tabla 5.** Resumen de las características clínicas de los pacientes con adenocarcinoma gástrico estudiados.

### 3.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo con la aprobación del Comité Ético de las Instituciones implicadas en el estudio. Las muestras de sangre se recogieron durante el seguimiento de rutina de los pacientes y todos los pacientes firmaron el pertinente consentimiento informado.

### 3.3 SECUENCIACIÓN DIRECTA DE CARD15

#### 3.3.1 OBTECIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de sangre total, requeridas para la extracción de ADN, se obtuvieron mediante venopunción, en tubos con EDTA como anticoagulante, consiguiéndose un volumen final de 10 ml por muestra de cada uno de los pacientes. Por otro lado, las muestras de suero necesarias para la detección de autoanticuerpos, fueron cedidas por el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Príncipe de Asturias de Alcalá de Henares.

#### 3.3.2 EXTRACCIÓN DE ADN

A partir de los tubos de sangre total se ha procedido a la extracción del ADN, utilizando el método del DNAzol según el protocolo del fabricante (DNAzol reagent, Carlsbad, CA, USA), que permite obtener muestras de calidad necesaria para someterlas a PCR (Polymerase chain reaction). Este método se basa en el aislamiento de la fracción leucocitaria tras la centrifugación de los tubos de ensayo y posterior uso de una solución de lisis de detergente de guanidina, que permite precipitación selectiva de ADN a partir del lisado celular. El ADN obtenido resuspendido en hidróxido sódico (NaOH) 8 mM (Panreac), se midió

espectrofotométricamente, para conocer su concentración ( $A_{260}$ ) y su pureza ( $A_{260}/A_{280}$ ) la cual debería encontrarse entre 1,6-1,8.

El ADN de las muestras de sangre de pacientes con adenocarcinoma gástrico, se extrajo mediante TRIzol, según el protocolo del fabricante (TRIzol reagent, Invitrogen, USA), que hace posible la obtención de ARN, ADN y proteínas a partir de una misma muestra. Este reactivo, es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. La adición de cloroformo seguido de una centrifugación, permite la separación de la solución en una fase acuosa y otra orgánica. De la fase acuosa se extrae el ARN con alcohol isopropílico. El ADN puede ser recuperado de la interfase tras precipitación secuencial con etanol.

### 3. 3.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN CARD15

Se han amplificado los 11 exones traducidos a proteína del gen CARD15. El exón 4 fue dividido en cinco partes para facilitar su amplificación, que se han denominado 4A, 4B, 4C, 4D y 4E. Para los exones 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y parte del exón 4 (4A, 4B, 4C) se han empleado cebadores y condiciones de amplificación por PCR, previamente descritos (Lesage et al., 2002) (ver tabla 6). Mientras que para la amplificación del resto de exones recurrimos al diseño de cebadores, gracias a la ayuda de la aplicación Primer3, del White Head Institute (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3> [www.cgi](http://www.cgi)) (ver tabla 6).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l, con 9  $\mu$ l de dNTPs (2,5 mM) (Deoxyribo-nucleosidetriphosphates), 5  $\mu$ l de tampón 10x, 0,25  $\mu$ l de polimerasa (5U/ $\mu$ l), 30,95  $\mu$ l  $H_2O$ , 2  $\mu$ l de cada uno de los primer y 0,8  $\mu$ l de la muestra de ADN correspondiente (200  $\mu$ g/ml).

EXÓN	FORWARD	REVERSE
2/1ºparte*	TGTTTCTTGCCTTCTCTGGG	TTCTGACAGGCCCAAGTACC
2/2ºparte*	CCAGCCTCTCTCCCACTTG	ACAGGCTGACTTCATGAGGA
3	ACATTGCTCCATCAGCCTTC	GACTGCCCTTCCCTTTCTG
4A	TGCCTCTTCTTCTGCCTTCC	AGTAGAGTCCGCACAGAGAG
4B	TTTCTCTTTGTCTTCCCATTC	CCCTGTTCAGAGAAGCCC
4C	GAAGTACATCCGCACCGAG	AGCCAAGAGAAATGTCATCAG
4D/1ºparte*	TGGGACCCAGTCTTCTTCG	CCTGCCACAATTGAAGAGGT
4D/2ºparte*	CCCCTGGAATTCCTTCACAT	AGTGGAAGTGCTTGCGGAG
4E*	CCTTCAGATCACAGCAGCCT	CTGAACAGCAATGCCAGTA
5	TTGTCTTACTAGCTCCATTTTC	AGCCCATTGTCCACAGCC
6*	TCCAATGTGCTTTGCTTCTG	TGCATTCAATCAGGAGGTCA
7	CGTCCCGCTGCCCCTTTC	ACTCTCTCCCTGGCTTGTC
8	AAGTCTGTAATGTAAAGCCAC	CCCAGCTCCTCCCTCTTC
9	CTTCCCTGCTCTGACATAC	CCCCAGAGCAGAGAATCC
10	GCTGCAATGGAGAGTGGG	CTTTATTGGTTACCTTCACTTC
11	CTCACCATTGTATCTTCTTTTC	GAATGTCAGAATCAGAAGGG
12	TAAAAACAGCCCTGACTTCC	AAACTCACAGCCTGCTCAC

**Tabla 6.** Cebadores empleados para realizar las reacciones de amplificación de los exones señalados del gen CARD15. Tanto en el exón 2 como en el 4D, tuvieron que usarse cebadores internos para facilitar su amplificación.

\* Los cebadores indicados, fueron diseñados con la ayuda de la aplicación Primer3.

Como control positivo se utilizaron los siguientes cebadores de la GAPDH:

Cebador 5' AAGGTCGGAGTCAACGGATTT

Cebador 3' GGGCCATGAGGTCCACCAC

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 2% en tampón TAE 1X (0,5 M EDTA pH8, tris, ácido acético glacial) teñidos con bromuro de etidio. Las bandas de ADN resultantes se visualizaron en un transiluminador, se recortaron y se purificaron para su posterior secuenciación mediante un kit comercial (Qiaquick gel extraction, Qiagen).

### **3.3.4 SECUENCIACIÓN DE ADN**

Las muestras amplificadas se han sometido a secuenciación directa, por métodos fluorescentes no radiactivos, utilizando las facilidades del Servicio Central de Secuenciación (C.A.I. de Secuenciación) existente en la UCM o en el CIB (Centro de Investigaciones Biológicas).

### **3.3.5 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS**

Las secuencias obtenidas se han analizado con el paquete informático TraceViewer o Chromas lite 2.01. Las secuencias se han comparado con la secuencia depositada en la base de datos del NCBI (con el número de acceso AJ303140 y AF178930) para ver en qué posición se encontraba el SNP (Single Nucleotide Polymorphism) en estudio.

## **3.4 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC**

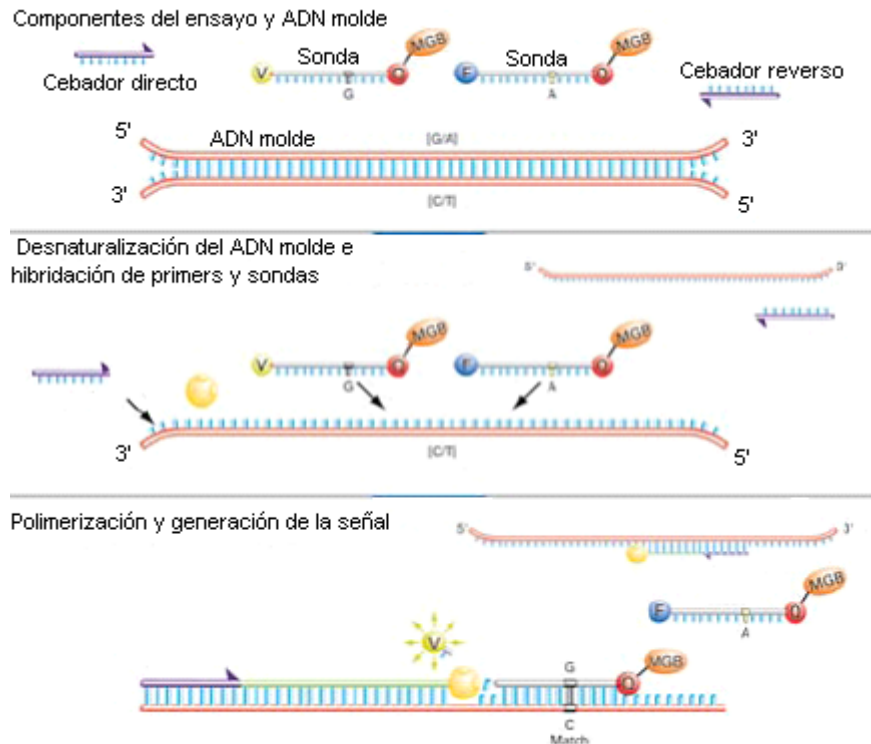
El genotipado de los polimorfismos se realizó mediante ensayos de genotipado TaqMan prediseñados (TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems) específicos para los polimorfismos P268S, R702W y G908R.

Cada ensayo de genotipado TaqMan contiene una pareja de cebadores para amplificar la secuencia polimórfica de interés, dos sondas MGB (minor groove binder) para distinguir entre los dos alelos y ADN polimerasa AmpliTaq Gold. Cada sonda MGB lleva unido en su extremo 5' un colorante reportero: VIC, en el caso de la sonda encargada de detectar



el alelo 1 del SNP y FAM, en el caso de la sonda encargada de detectar el alelo 2; mientras que en el extremo 3', la sonda tiene unida una molécula MGB que se une al surco menor de la hélice de ADN. Esta incorporación aumenta la temperatura de fusión ( $T_m$ , melting temperature) para una sonda de una longitud determinada (Afonina et al., 1997; Kuttyavin, Lukhtanov, Gamper, & Meyer, 1997) y mejora la hibridación porque estabiliza el complejo sonda/ADN molde. El aumento de la estabilidad de la unión permite usar sondas más cortas (de hasta 13 bases); lo que genera, mayores diferencias en los valores de  $T_m$  entre sondas unidas y desunidas. La diferencia en un sólo nucleótido entre la sonda y la secuencia de interés disminuirá la eficiencia de hibridación de la sonda, lo cual permite conseguir una discriminación alélica robusta. Todas las sondas MGB incluyen además un colorante quencher no fluorescente (NFQ, non-fluorescent quencher) en el extremo 3', que proporciona una mejor proporción señal/ruido y por tanto, se consigue una mayor sensibilidad.

Durante la reacción de PCR, cada sonda TaqMan MGB, hibridará específicamente con su secuencia complementaria, y la DNA polimerasa empezará a polimerizar desde los cebadores unidos al ADN molde hasta llegar al extremo 5' de la sonda hibridada con la hebra de ADN molde. En ese punto escindirán (por su actividad exonucleasa) sólo las sondas que hayan hibridado con la secuencia diana, lo cual provocará la separación del colorante reportero del colorante quencher y por tanto, llevará a un aumento de fluorescencia por parte del reportero y esa señal fluorescente generada por la amplificación de la PCR, indicará qué alelos están presentes en la muestra. Por el contrario, cuando la sonda no se une a la secuencia diana, permanecerá intacta y la proximidad del colorante reportero al colorante quencher hará que no se emita fluorescencia, porque ésta es transferida del colorante reportero al quencher mediante transferencia de energía de tipo Förster (FRET; Förster resonance energy transfer) (Förster, 1948; Lakowicz, 1983) (ver figura 7).



**Figura 7.** Fundamento de la técnica de genotipado por sonda TaqMan. Modificado de TaqMan SNP Genotyping Assays Protocol.

Las condiciones en las que la reacción se ha llevado a cabo se muestran a continuación, en las tablas 7 y 8.

Componentes de la reacción	Volumen/pocillo (volumen de reacción 20 µl)	Concentración final
TaqMan Universal PCR Master Mix	10	1x
20x TaqMan SNP Genotyping Assay Mix*	1	1x
ADN genómico diluido en H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> (10ng)	9	2ng/µl
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>--</b>

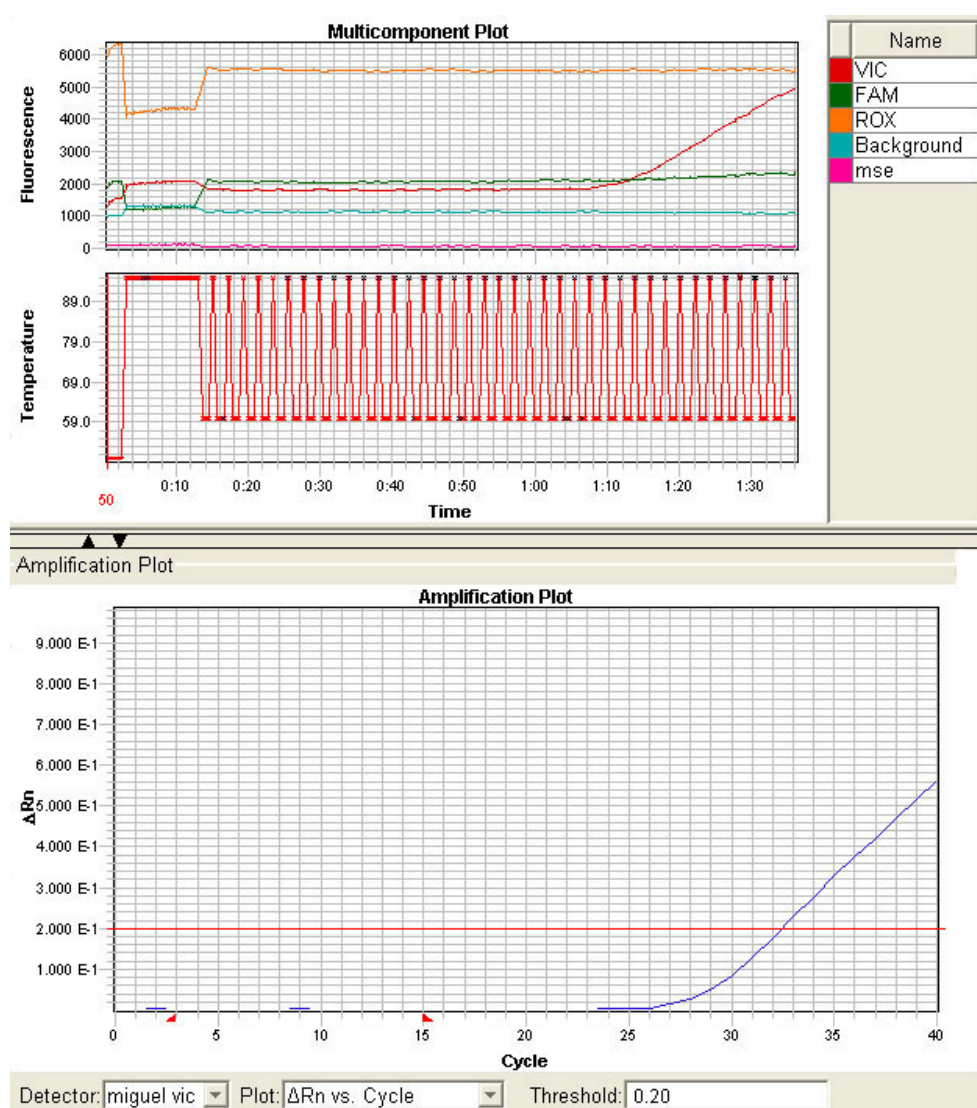
**Tabla 7.** Reacción de PCR realizada para la discriminación alélica.

\* Las mezclas del ensayo a 40x se diluyeron a 20x con TE 1x (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8 en ddH<sub>2</sub>O destilada).

Condiciones de la PCR		
<b>Desnaturalización inicial</b>	Desnaturalización	Hibridación/Extensión
	40 CICLOS	
<b>10 min 95 °C</b>	15 sec 92 °C	1min 60 °C

**Tabla 8.** Condiciones de la PCR realizada en el termociclador Applied Biosystems Real-Time PCR 7900 HT Fast System.

Tras la PCR realizada en un termociclador Real-Time PCR 7900HT Fast System (Applied Biosystems), los datos fueron analizados con la ayuda del programa informático SDS (Sequence Detection Software) v2.2. Con la gráfica titulada Multicomponent Plot (ver figura 8) se puede comprobar si la muestra analizada presenta o no un SNP estudiado y en el caso de que lo presente, si es homocigota o heterocigota para ese SNP. Por otra parte, la gráfica titulada Amplification Plot, permite identificar amplificaciones irregulares.



**Figura 8.** Gráficas obtenidas con el programa informático SDS a partir de una muestra estudiada para el SNP. La gráfica Multicomponent Plot nos indica que el individuo es homocigoto silvestre para el SNP L469F, puesto que sólo genera señal la sonda VIC (en

caso de que hubiera sido heterocigoto, ambas sondas habrían generado señal fluorescente).

### 3.5 DETERMINACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER SÍNDROME DE BLAU.

#### ESTUDIO DEL SNP L469F

El genotipado del polimorfismo L469F se realizó mediante un ensayo de genotipado TaqMan diseñado con la ayuda del programa File Builder (Custom TaqMan SNP Genotyping Assays, Applied Biosystems). El fundamento de estos ensayos es el mismo que el de los ensayos de genotipado TaqMan prediseñados.

#### ESTUDIO DE LOS SNP R334Q Y R334W

Los polimorfismos R334Q y R334W se estudiaron por secuenciación directa y PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism).

Con el fin de estudiar los polimorfismos por PCR-RFLP, se diseñaron unos cebadores específicos que nos permitieran amplificar la región de interés (ver tabla 9), que después se sometería a una reacción de digestión con la enzima de restricción MspI, seleccionada gracias a una aplicación informática diseñada para la detección de puntos de corte por enzimas de restricción: NEBcutter (BioLabs).

REGIÓN DEL SNP	FORWARD	REVERSE
334	<i>TGACGATGCGGACACTGTGC</i>	<i>AACAGGACACGGTCAGGGTG</i>

**Tabla 9.** Cebadores empleados para realizar las reacciones de amplificación de la región circundante a los SNP R334Q Y R334W del gen CARD15.

Las condiciones de PCR empleadas para la amplificación de la región de interés fueron las siguientes (ver tabla 10):

<b>Desnaturalización inicial</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Extensión final</b>
<b>95 °C 10 min</b>	33 CICLOS 94°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 30 sec	72 °C 10 min

**Tabla 10.** Condiciones de la PCR realizada en el termociclador 2720 Applied Biosystems.

### PCR-RFLP

La reacción de digestión se llevó a cabo con 10 ng de producto de la PCR anterior, que fueron digeridos con 0,3 µl de la enzima de restricción MspI (Roche Diagnostics) y 2,5 µl de tampón (Roche Diagnostics) en un volumen final de 25 µl durante 8h a 37 °C.

El producto de la digestión se corrió en un gel de poliacrilamida al 10% en cubetas verticales con buffer de electroforesis (glicina, tris) y para un volumen de 35 ml por gel. Las dimensiones de dichos geles eran de 12,7 x 13,4 x 0,15 cm y la mezcla necesaria para su elaboración se muestra en la tabla 11.

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD (ml)</b>
Solución Acrilamida-Bisacrilamida 29:1 30% (Bio-Rad)	11,6
H <sub>2</sub> O destilada	16
TBE5x (Tris 0,45M; Ac.Bórico 0,44M; EDTA 0,5 M pH8)	7,5
Persulfato amónico 10% p/v	0,240
TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilendiamina)	0,017

**Tabla 11.** Componentes empleados para la elaboración de un gel de acrilamida al 10%.

El buffer de carga empleado fue buffer GelPilot DNA Loading Dye, 5x (Quiagen). En cada carril se aplicó 10 µl de producto y 3,5 µl de dicho buffer de carga. También se aplicaron 5 µl de patrón de peso molecular en un carril junto con 2 µl de buffer de carga. Para la tinción de las bandas del gel, se siguió un protocolo de tinción mediante nitrato de plata, consistente en un

prefijado con una mezcla de metanol y ácido acético, aclarado, y posterior baño del gel en una solución de 20  $\mu$ l de dTT (dithiothreitol) 0,032mM, tinción del gel con una solución al 0,1% de nitrato de plata y tras su aclarado en  $H_2O_{dd}$ , revelado con una mezcla de carbonato sódico al 3% y formaldehído al 37%, hasta la aparición de bandas, momento en que la reacción se paró con ácido acético al 5%. Finalmente se realizaron varios lavados con  $H_2O_{dd}$ . Las bandas de ADN resultantes se visualizaron con luz visible.

### **3.6 DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN SUEROS DE PACIENTES CON UVEÍTIS**

Dado que no hay disponibles ensayos de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) comerciales para la detección de autoanticuerpos frente a  $\alpha$ -cristalina, se procedió diseñar un ensayo de ELISA propio, que permitiera llevar a cabo este estudio. Empleamos  $\alpha$ -cristalina recombinante humana (CRYAA) (Alexis Biochemicals), como antígeno pegado a una placa de 96 pocillos (Sigma-Aldrich). Los pocillos fueron cargados con 100  $\mu$ l de CRYAA (5  $\mu$ g/ml) y se dejaron incubando toda la noche a 4°C, después se realizaron tres lavados con TBS (Tris Buffered Saline) y bloqueo con leche en polvo 2% en TBS con Tween20 al 0.05% durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras de suero (ver tabla 4), analizadas por duplicado, se emplearon a una dilución 1/50 en TBS con Tween20 al 0.05% y leche en polvo al 2% y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados con TBS, el anticuerpo secundario empleado para detectar la presencia de autoanticuerpos frente a  $\alpha$ -cristalina, fue un anticuerpo frente a IgG humana conjugado con peroxidada de rábano (HRP, horseradish peroxidase) (Sigma-Aldrich) y se empleó a una dilución 1/50 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, fue añadido ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid)) (0,1mg/ml) como sustrato cromogénico (Sigma-Aldrich).

El blanco empleado fue leche 2% en TBS con Tween20 al 0.05% y la medida de la densidad óptica se realizó a 405 nm, en un lector de ELISA (Microplate autoreader.Bio-Tek instruments.Cultek).

Con la finalidad de construir una recta patrón, que nos permitiera transformar las medidas de densidad óptica de nuestros sueros en unidades relativas (UR) y poder comparar los niveles de autoanticuerpos de las distintas muestras, se utilizó el suero más positivo para realizar las siguientes diluciones del mismo: 1/25, 1/50, 1/100, 1/250, 1/500. El protocolo seguido fue el mismo que el descrito anteriormente y se realizó simultáneamente al análisis de los sueros, en la misma placa de ELISA y cada dilución se analizó por duplicado.

La especificidad de nuestros sueros frente al antígeno empleado, fue comprobada mediante western blot con un suero de un paciente y un suero de un individuo control.

### **3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La frecuencia alélica de los polimorfismos considerados, se calculó mediante conteo directo (alelos con cambio/ alelos totales). La frecuencia de los diferentes polimorfismos en el grupo de pacientes se comparó con la del grupo de sujetos sanos mediante el test de Fisher de probabilidad exacta. También fueron calculados los odds ratio (O.R) y los intervalos de confianza (C.I). Un valor p menor que 0,05 se consideró significativo.

## **4. RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS EXONES DEL GEN CARD15

Paralelamente al estudio de los polimorfismos asociados a EC y a SB, se procedió a secuenciar todos los exones traducidos a proteína del gen CARD15 mediante secuenciación directa. El número de muestras secuenciadas para cada uno de los exones del gen CARD15 se muestra en la siguiente tabla (ver tabla 12).

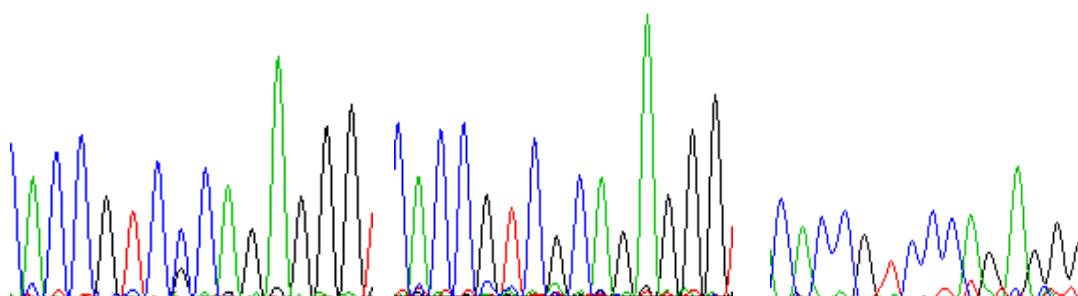
EXÓN	CONTROLES	PACIENTES			
		UA	UI	UP	U.INFECCIOSA
2	8	1	2	1	
3	9	8	8	7	4
4A	38	11	10	12	6
4B	12	9	6	4	2
4C	5	2	3	4	1
4D	3	1	1	1	
4E	3	1	1	1	
5	12	6	6	6	
6	3	1	1	1	
7	9	9	9	8	
8	11	7	4	6	3
9	3	1	1	1	
10	12	4	2		
11	70	30	18	14	15
12	3	1	1	1	

**Tabla 12.** Número de pacientes y controles secuenciados, por secuenciación directa, en los exones del gen CARD15 estudiados. UA: uveítis anterior; UI: uveítis intermedia; UP: uveítis posterior.

## EXÓN 2

Se ha encontrado una transversión de citosina a guanina (C→G) en el nucleótido 534, anteriormente descrita, que no se traduce en cambio de aminoácido (S178S) (ver figura 9). Con el fin de homogeneizar criterios, la numeración de los nucleótidos del gen CARD15, se ha basado en la secuencia más larga publicada por Ogura et al. (2001) (con número de acceso en el GenBank AF178930), de modo que la primera base del codon de iniciación ATG, fue designada como el nucleótido +1.

∴ ACCG T C C C A G A G G G ∴ ACCG T C C C A G A G G G ∴ C A C C G T C C C A G A G G G



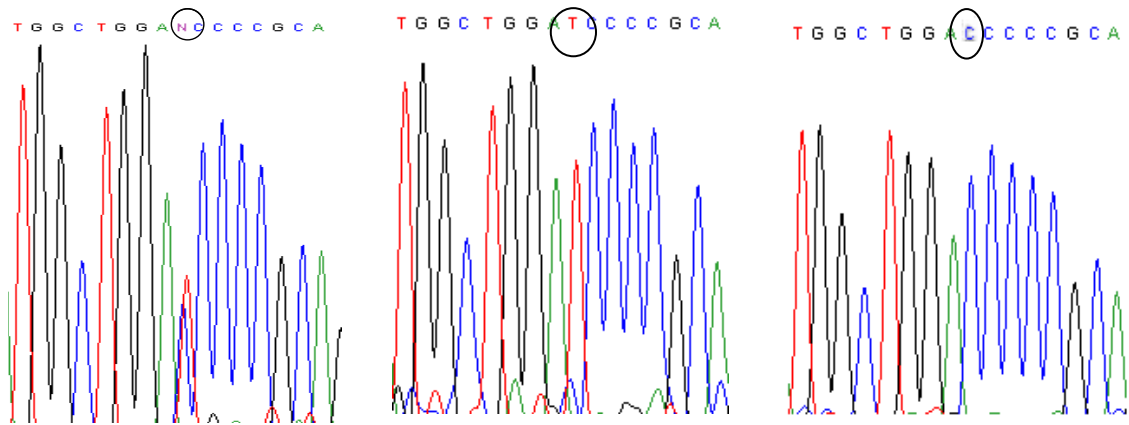
**Figura 9.** Cromatogramas del exón 2, de izquierda a derecha: individuo heterocigoto, homocigoto y homocigoto silvestre para el polimorfismo S178S.

## EXÓN 3

Ninguna de las muestras de ADN secuenciadas mostró polimorfismo alguno, siendo idénticas a la secuencia depositada en el GenBank.

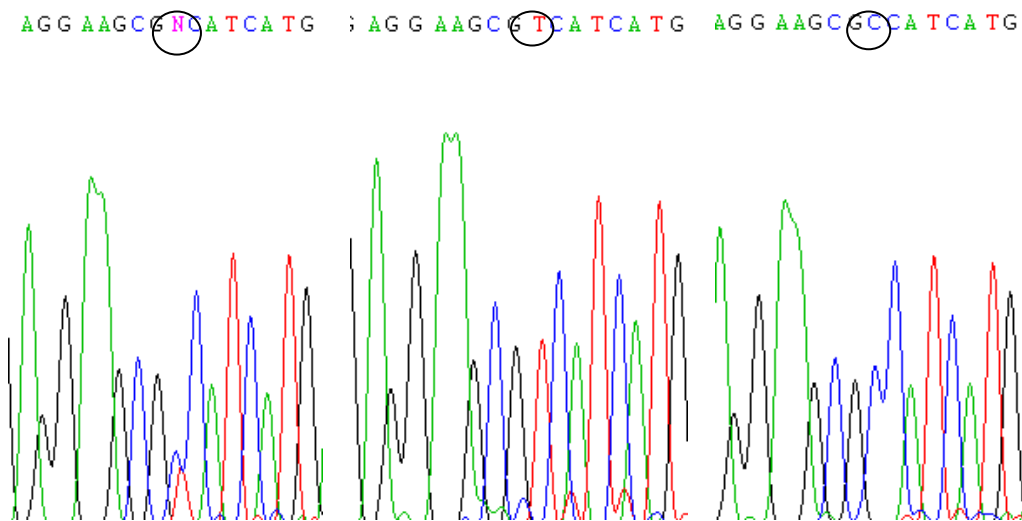
## EXÓN 4

En cuanto al fragmento 4A del exón 4, se obtuvieron secuencias de 38 controles y 33 pacientes. En dichas secuencias, se encontró una transición de citosina a timina (C/T) en el nucleótido 802, previamente descrita, que se traduce en un cambio de prolina a serina en el aminoácido 268 (P268S). De los 38 controles, 13 presentaron prolina en homocigosis y otros 3, prolina y serina. Sin embargo, en el grupo de pacientes, 9 fueron heterocigotos (prolina/serina) y 6 fueron homocigotos para serina (ver figura 10).



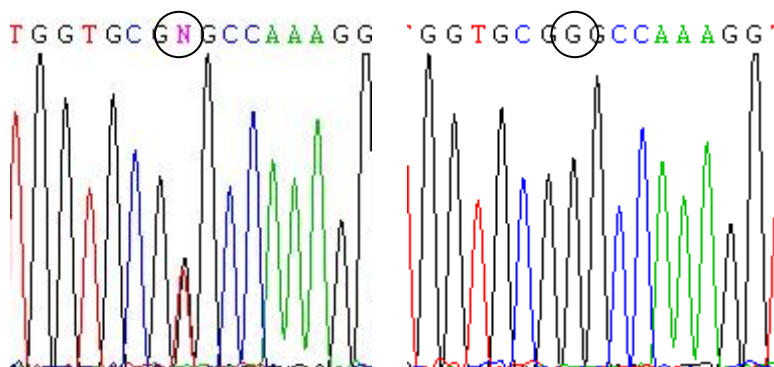
**Figura 10.** Fragmento 4A del exón 4: individuo heterocigoto, homocigoto y homocigoto silvestre para la mutación P268S.

En el fragmento 4B, ninguna secuencia presentó ningún cambio. A diferencia del fragmento 4C, en que algunas de las secuencias analizadas presentaron un polimorfismo ya descrito, R459R, producido como consecuencia de una transición de citosina a timina (C/T) en el nucleótido 1377 (ver figura 11).



**Figura 11.** Fragmento 4C del exón 4: individuo heterocigoto, homocigoto y homocigoto silvestre para la mutación R459R.

En el fragmento 4D, se presentó el polimorfismo R587R (anteriormente descrito), tanto en homocigosis como en heterocigosis. Este polimorfismo se produce como consecuencia de una transversión de timina por guanina (T/G) en el nucleótido 1761(ver figura 12).



**Figura 12.** Fragmento 4D del exón 4: individuo heterocigoto, homocigoto para el polimorfismo R587R.

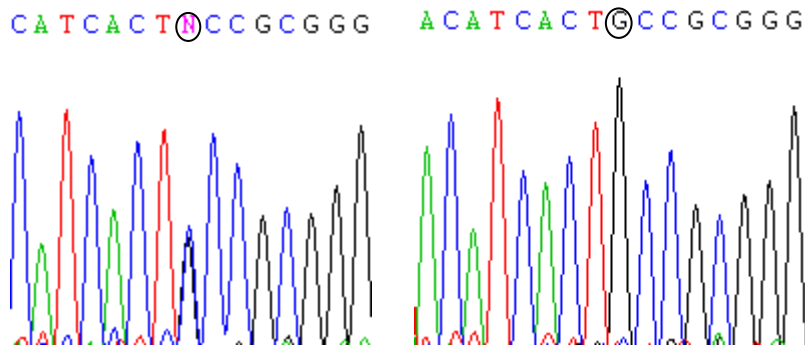
Finalmente, en el fragmento 4E ninguna de las muestras de ADN secuenciadas mostró polimorfismo alguno.

## EXÓN 5 Y 6

Ninguna de las muestras de ADN secuenciadas mostró variación con respecto a la secuencia consenso.

## EXÓN 7

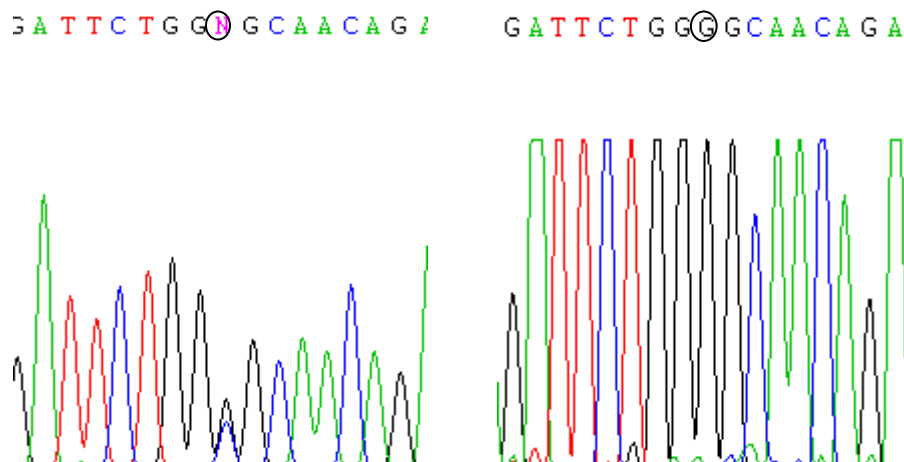
Un control presentó en heterocigosis un polimorfismo que no había sido descrito anteriormente para *Homo sapiens* (A884P) aunque si se había encontrado en el primate hominoideo *Hylobates lar*, en la posición, 2653 del ARNm. El polimorfismo consiste en una transversión de citosina por guanina (C/G) y conduce a un cambio de alanina por prolina (A884P) y ha sido registrado en el Genbank con el número de acceso FJ755457 (ver figura 13). El resto de las secuencias analizadas fueron homocigotos silvestres.



**Figura 13.** Cromatogramas del exón 7: individuo heterocigoto, homocigoto silvestre para el polimorfismo A884P.

## EXÓN 8

Han sido analizados 11 controles y 17 pacientes. Se ha encontrado en uno de los controles y en uno de los enfermos, un polimorfismo anteriormente descrito en el nucleótido 2722, una transversión de guanina a citosina (G/C), G2722C, lo que se traduce en un cambio de glicina a arginina en el aminoácido 908 (G908R) (ver figura 14).



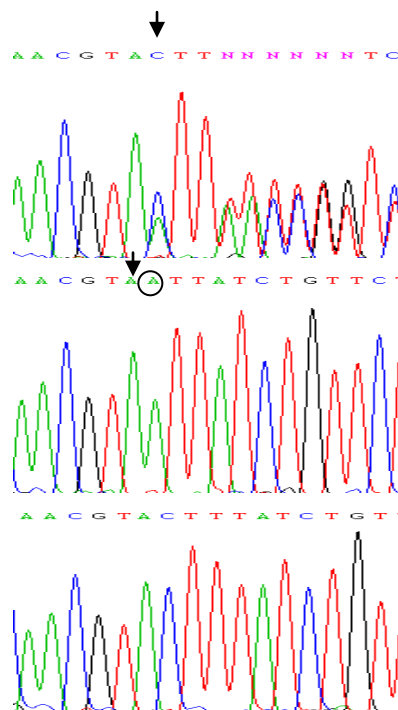
**Figura 14.** Cromatogramas del exón 8, individuo heterocigoto y homocigoto silvestre para el polimorfismo G908R

## EXÓN 9 Y 10

No se ha encontrado ninguna variación con respecto a la secuencia consenso en ninguna de las muestras de ADN estudiadas.

Sin embargo, si se detectó una delección de una citosina en la región intrónica anterior al comienzo del exón 10. Esta delección se presentó en homocigosis en 2 controles, y en heterocigosis en 4 pacientes y 9

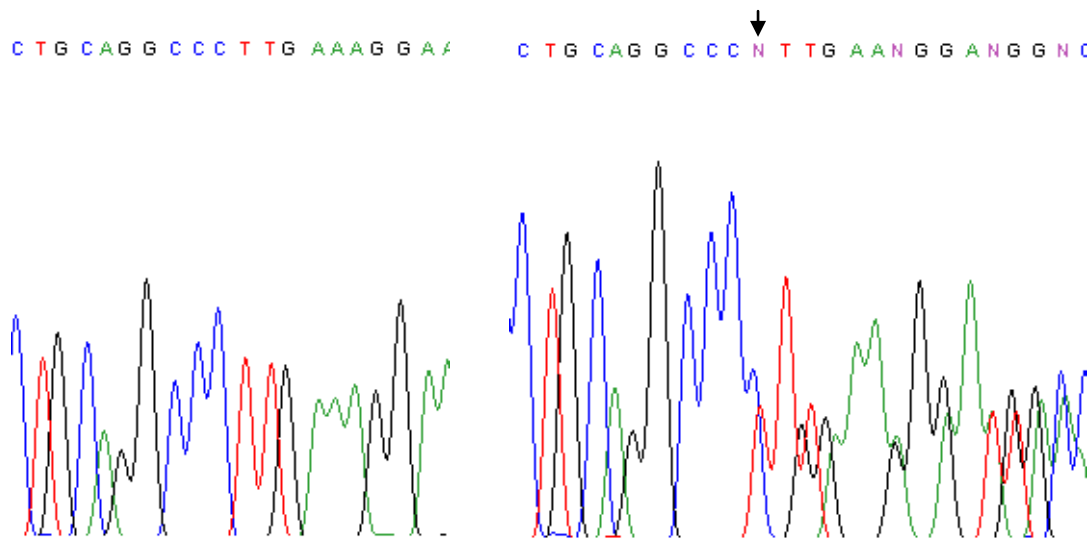
controles. También se detectó una transversión de timina por adenina T/A de manera simultánea a la delección. Ambos cambios estaban previamente descritos (ver figura 15).



**Figura 15.** Región intrónica adyacente al extremo 5' del exón 10. El primer cromatograma pertenece a un individuo heterocigoto para la delección de C y para la transversión T/A. El cromatograma central muestra un individuo homocigoto para delección y para la transversión T/A, y el último cromatograma muestra un individuo sin ninguno de los cambios mencionados.

## EXÓN 11(Dominio LRR)

Se han analizado 70 controles y 70 pacientes. En esta región se ha descrito una inserción de citosina en el nucleótido 3020 (3020*insC*) que sólo ha sido presentada por uno de los pacientes y por tres controles, como se comentará con más detalle en el apartado 4.2 (ver figura 16).



**Figura 16.** Exón 11: individuo homocigoto (izquierda) y heterocigoto (derecha) para la inserción 3020insC.

## EXÓN 12

No se han producido variaciones con respecto a la secuencia consenso en las secuencias obtenidas en este exón.

## 4.2 POLIMORFISMOS DE CARD15 ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PACEDER EC EN PACIENTES CON UVEÍTIS IDIOPÁTICA

Los resultados obtenidos para los distintos marcadores analizados, se han obtenido tanto para el grupo de pacientes con uveítis idiopática, como para sus distintos subgrupos (uveítis anterior, intermedia o posterior). Conviene resaltar que el diagnóstico de uveítis idiopática ha sido independiente de la localización anatómica de la inflamación ocular o de la presencia de cualquier otra condición inflamatoria concomitante. Por lo que, podemos afirmar que el grupo de pacientes es relativamente homogéneo y podemos llevar a cabo el análisis antes mencionado (del grupo con uveítis idiopáticas en su conjunto y de sus diferentes subconjuntos).

El polimorfismo P268S, estudiado mediante ensayo de genotipado TaqMan y por secuenciación directa, está presente en el 50% de los

pacientes (su frecuencia génica es 0.284) y en el 44% de los controles (frecuencia génica 0.245), una diferencia que no es estadísticamente significativa. En el estudio de este SNP, también se han considerado los tres subtipos de uveítis (anterior, intermedia y posterior) en que se ha dividido nuestra población de pacientes, pero las diferencias halladas no han sido estadísticamente significativas, aunque se ha encontrado una mayor frecuencia de cambio en el grupo de uveítis anteriores (57%, n=70), frente al grupo de uveítis intermedias (47%, n=19) y frente al de uveítis posteriores (32%, n=22) (ver tabla 13).

En lo referente al polimorfismo R702W, gracias al ensayo de genotipado TaqMan, se pudo comprobar que está presente en el 7% de los pacientes (frecuencia génica 0.036) y en el 7% de los individuos control (frecuencia génica 0.033), con lo que no se han encontrado diferencias significativas. Desglosando el grupo de pacientes en los tres subtipos considerados, hemos encontrado que el 10% de pacientes con uveítis anterior (n=70) presentaba el cambio, dicho cambio no se presentó en el grupo de uveítis intermedias (n=19) y estaba representado en un 5% en el grupo de uveítis posteriores (n=22), pero no se observaron diferencias significativas en ningún caso (ver tabla 13).

El polimorfismo G908R se encuentra en el 2% de los pacientes (frecuencia génica 0.009) y en el 4% de los individuos control (frecuencia génica, f= 0.019), no existiendo una vez más diferencias significativas entre los dos grupos. Cuando los pacientes se han analizado atendiendo a su tipo de uveítis, este polimorfismo se ha encontrado en el 1% de las uveítis anteriores (n=70), no se ha presentado en ninguna uveítis intermedia (n=19) y ha aparecido en el 5% de pacientes con uveítis posteriores (n=22) (ver tabla 13).

En lo referente a la inserción de citosina en el exón 11 (1007fs), a diferencia de los SNP anteriores, fue estudiada por secuenciación directa. La secuencia obtenida en todos los subconjuntos de pacientes, fue idéntica a la secuencia consenso publicada en el NCBI, excepto en un paciente con



uveítis intermedia (n=70, 2%;  $f=0.007$ ) y en tres individuos control (n=70, 4%;  $f=0.021$ ), en los cuales se encontró la inserción de la citosina en heterocigosis en el nucleótido 3020 (3020insC) (ver tabla 13).

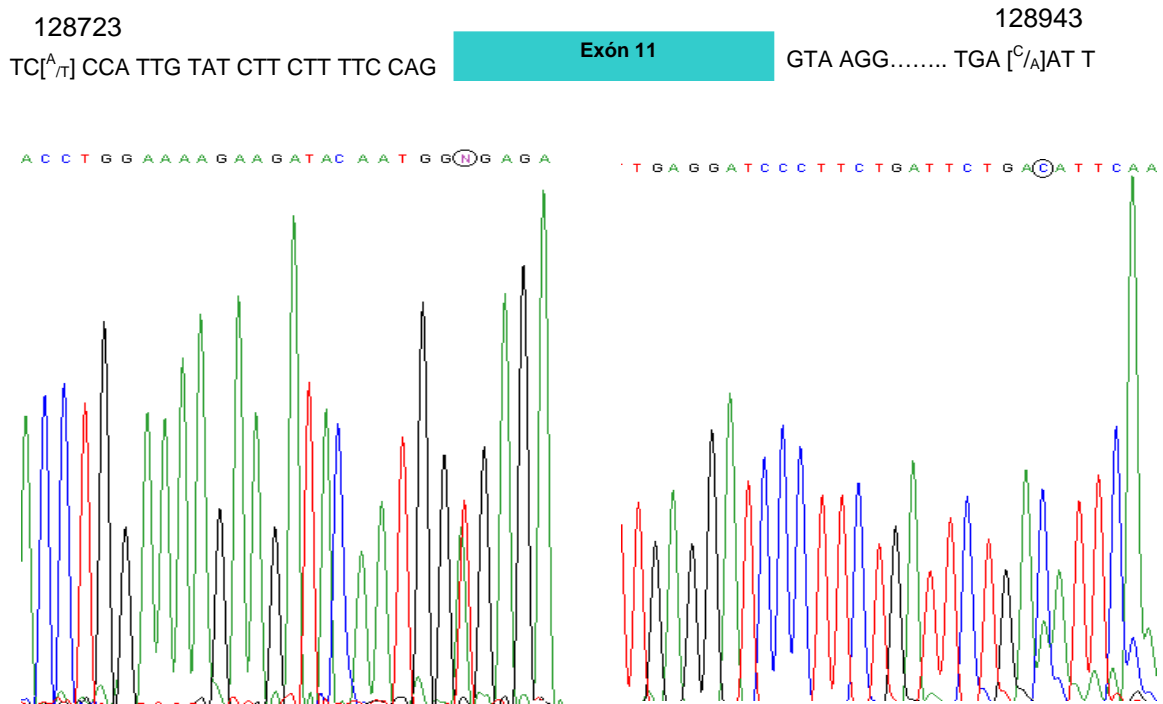
SNP	PACIENTES (n=111; 70 UA, 19 UI, 22 UP) %/ frecuencia alélica	CONTROLES (n=105) %/ frecuencia alélica	pVALOR
<b>P268S</b>	50/ 0.284 UA 57, UI 47, UP 32	44/ 0.245	n.s
<b>R702W</b>	7/ 0.036 UA 10, UI 0, UP 5	7/ 0.033	n.s
<b>G908R</b>	2/ 0.009 UA 1, UI 0, UP 5	4/ 0.019	n.s
<b>1007fsinsc*</b>	2/ 0.007 UA 0, UI 1, UP 0	4/ 0.021	n.s

**Tabla 13.** Resultados obtenidos para los polimorfismos estudiados en el grupo de pacientes con uveítis idiopática y en los diferentes subconjuntos del mismo (UA: uveítis anterior, UI: uveítis intermedia, UP: uveítis posterior).

La frecuencia génica fue determinada mediante recuento génico directo.

\* Sólo fueron secuenciados 70 pacientes (32 UA, 19 UI, 19UP) y 70 individuos control.

El análisis de las regiones 5' y 3' adyacentes al exón 11 (en las secuencias obtenidas con la secuenciación directa del exón 11), reveló la presencia de dos polimorfismo intrónicos, que no habían sido descritos hasta el momento, en las posiciones 128723 (extremo 5') y 128943 (extremo 3'). Mientras que la mayoría de individuos presentan una adenina (A) en homocigosis en la posición 128723, y una citosina (C) en la posición 128943, 9 pacientes (15%) y 4 controles (6%,  $p$  n.s), portaban un polimorfismo consistente en una transversión de adenina por timina (A/T) en heterocigosis en la primera posición y simultáneamente, una transversión de citosina por adenina (C/A), también en heterocigosis, en la segunda posición (ver figura 17). No se encontraron individuos homocigotos para estos cambios, que fueron registrados en el GenBank, con el número de acceso DQ869189.



**Figura 17.** Cromatogramas de las regiones 5' y 3' adyacentes al exón 11. El cromatograma de la izquierda muestra el cambio producido en la posición,128723 mientras que el cromatograma de la derecha muestra el cambio producido en el nucleótido 128943.

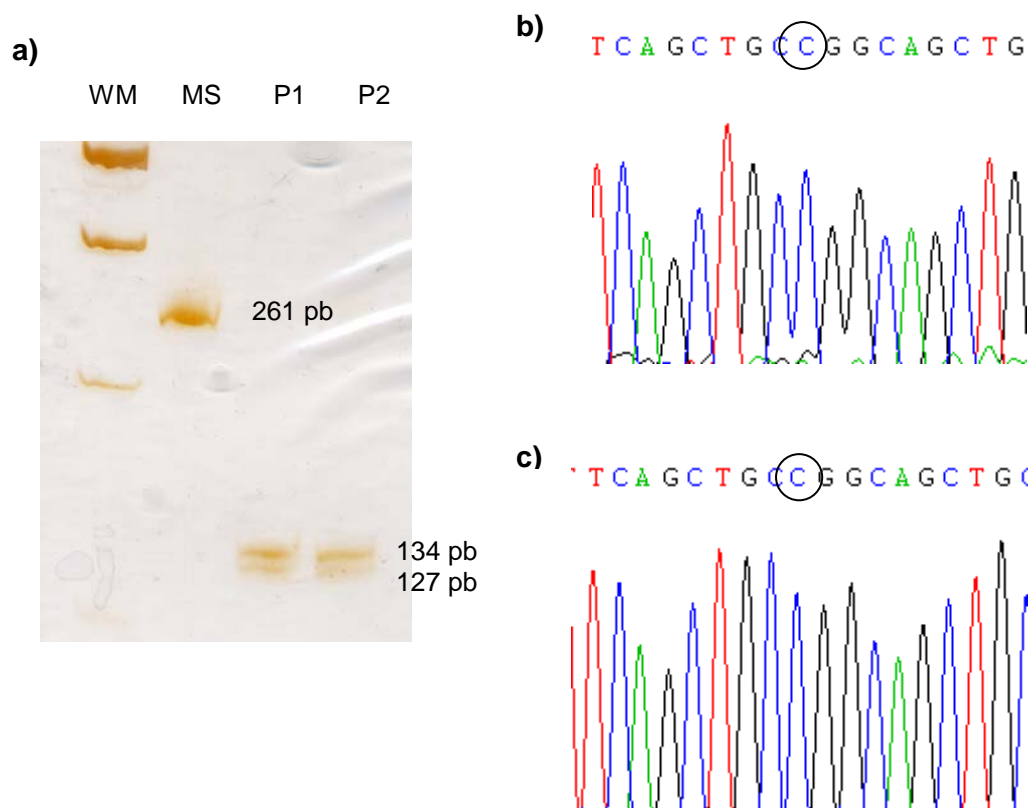
Finalmente, se consideró la positividad en al menos uno de los marcadores anteriormente mencionados, y no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el grupo control (50% vs 43%, p n.s). Al considerarse cada subgrupo del conjunto de pacientes, un 57% de los pacientes con UA presentaron al menos uno de los SNP mencionados, frente a un 47% de pacientes con UI y un 31% de los pacientes con UP, no observándose diferencias significativas en ninguno de los casos con respecto al grupo de individuos control. También se dividió el grupo de pacientes según presentaran o no enfermedad sistémica y se consideró la positividad para al menos uno de los SNP asociados a EC. Los pacientes con enfermedad sistémica (n=27) presentaron al menos un SNP en el 63% de los casos, frente a un 52% de los pacientes sin enfermedad sistémica (n=84), con lo que no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.

#### 4.3 POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER SB

Los polimorfismos asociados a susceptibilidad a padecer SB, fueron estudiados mediante secuenciación directa y PCR-RFLP, como se ha explicado en el apartado Material y métodos. Ninguno de los pacientes y controles analizados (ver tabla 14) para los polimorfismos considerados (R334W, R334Q, L469F) presentó ningún cambio, todos fueron homocigotos silvestres para estas mutaciones descritas para SB (ver figura 18). Nuestros resultados indican, por tanto, que estos polimorfismos no son factores de riesgo para el desarrollo de uveítis idiopáticas.

SNP	CONTROLES	PACIENTES		
		UA	UI	UP
<b>R334W, R 334Q</b>	90	70	19	26
<b>L469F</b>	103	70	18	22

**Tabla 14.** Número de controles y pacientes empleados para estudiar los polimorfismos asociados a susceptibilidad a padecer SB.



**Figura 18.** **a)** Gel de poliacrilamida donde se muestra el resultado de la PCR-RFLP obtenida cuando se analizó la posición 334. La digestión de los amplificadores con MspI, dio lugar a dos bandas de 134 y de 127 pares de bases, indicando que no se produjo cambio de ninguna base en las muestras de ADN. La presencia de una variante génica (R334W, R334Q) daría como resultado una única banda de 261 pares de bases. Estos resultados fueron confirmados mediante secuenciación directa de las muestras de ADN. La secuencia obtenida fue igual en todas las muestras, tanto de pacientes como de controles, y a su vez fue igual a la secuencia depositada en el NCBI (GeneBank accesión number AJ303140.11 HSA303140). WMW: Patrón de peso molecular XIV (Roche); MS: Muestra de un paciente sin digerir; P1: Amplificado del ADN de un paciente sometido a PCR-RFLP; P2: Producto de la PCR-RFLP de otro paciente; pb: pares de bases. **b)** Cromatograma del paciente 1, que confirma que el paciente es homocigoto silvestre para los polimorfismos. **c)** Cromatograma del paciente 2, también muestra que este paciente es homocigoto silvestre para los polimorfismos.

#### 4.4 RESULTADOS EN EL GRUPO DE PACIENTES CON UVEÍTIS INFECCIOSA

No se encontró diferencia significativa entre las frecuencias de pacientes y controles para ninguno de los polimorfismos estudiados, en el grupo de pacientes con uveítis infecciosa (ver tabla 15).

##### POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PACEDER EC

El polimorfismo P268S se ha encontrado en el 60% de los pacientes (frecuencia génica,  $f=0,33$ ) y en el 44% de los controles ( $f=0,245$ ), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. Tampoco se han hallado diferencias significativas con el polimorfismo R702W, ya que se ha presentado en el 13% de los pacientes ( $f=0,66$ ) y en el 7% de los individuos control ( $f=0,033$ ). El polimorfismo G908R no se presentó en ninguno de los pacientes estudiados y se ha encontrado en el 4% de los controles ( $f=0,019$ ), no hallándose diferencias significativas entre los dos grupos. Finalmente, la secuencia del exón 11 obtenida tanto para controles como para pacientes, fue idéntica a la secuencia consenso publicada en el NCBI, excepto para un paciente ( $n=15$ , 7%;  $f=0,033$ ) y tres individuos control ( $n=70$ , 4%;  $f=0,021$ ), en los que se encontró la inserción de una citosina en la posición 3020 (ver tabla 15).

##### POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PACEDER SB

Ninguno de los polimorfismos descritos para SB (R334W, R334Q, L469F) fue encontrado en alguno de los individuos estudiados, pacientes o controles (ver tabla 15).

Por tanto, no se encontró ninguna asociación entre la uveítis infecciosa y cualquiera de las siete mutaciones de CARD15 estudiadas.

POLIMORFISMO	PACIENTES (N= 15) %/ frecuencia alélica	CONTROLES (N= 105) %/ frecuencia alélica	p VALOR / O.R. / I. C.
Polimorfismos EC			
P268S	60%/ 0,33	44%/ 0,245	n.s. / 1,8 / (0,65-5,18).
R702W	13%/ 0,066	7%/ 0,033	n.s./ 1,9 / (0,35-9,85)
G908R	0%/ 0,0	4%/ 0,019	n.s. / - / -
1007fs*	7%/ 0,033	4%/ 0,021	n.s. / 1,9 / (0,18-19,42)
Polimorfismos SB			
R334W	0%/ 0,0	0%/ 0,0	n.s. / - / -
R334Q	0%/ 0,0	0%/ 0,0	n.s. / - / -
L469F	0%/ 0,0	0%/ 0,0	n.s. / - / -

**Tabla 15.** Resultados obtenidos para los polimorfismos estudiados en el grupo de pacientes con uveítis infecciosa. La frecuencia alélicas fue determinada mediante recuento génico directo.

EC: Enfermedad de Crohn; SB: Síndrome de Blau.

\*Sólo fueron secuenciados 70 individuos control. O. R. Odds Ratio. I. C. Intervalos de confianza.

#### 4.5 POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PACEDER EC EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

En los pacientes con adenocarcinoma gástrico, los polimorfismos asociados a susceptibilidad a padecer EC fueron estudiados por ensayos de genotipado TaqMan excepto el exón 11, que se analizó mediante secuenciación directa. Los resultados obtenidos se expresan a continuación:

P268S n=24

El 63% de los pacientes presentaron el polimorfismo (en heterocigosis), frente a un 44% de los controles.

R702W n=22

El 5% de los individuos con adenocarcinoma gástrico presentaron el polimorfismo en heterocigosis, mientras que en los controles la frecuencia de cambio fue de un 7%.

G908R y 1007fs

Ningún paciente presentó el polimorfismo G908R ni el 1007fs. En la población control, ambos cambios se presentaron en un 4% de los individuos.

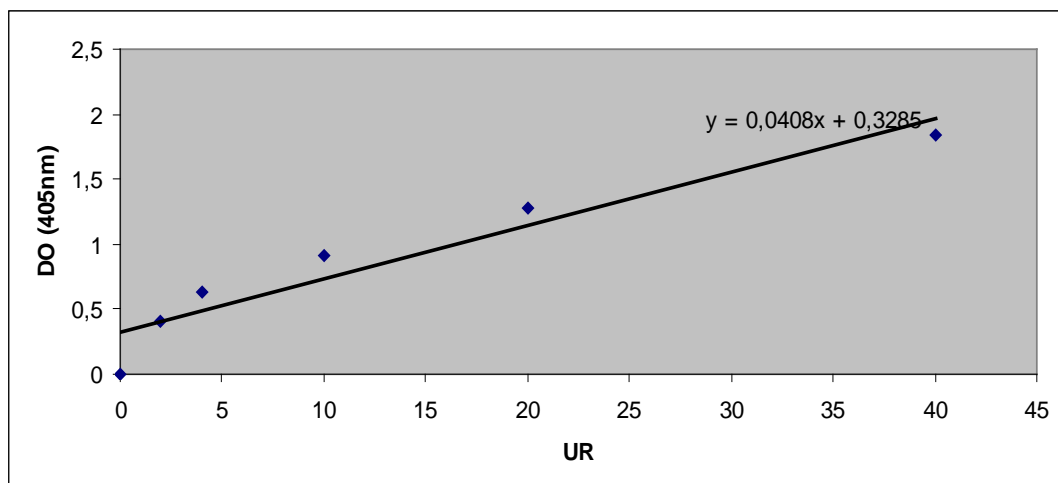
En cualquier caso, las diferencias encontradas en los polimorfismos estudiados no fueron estadísticamente significativas.

En estos pacientes también fue analizado el polimorfismo L469F, asociado a susceptibilidad a padecer SB, y ninguno de los individuos estudiados (paciente o control) presentó el cambio.

#### 4.6 AUTOANTICUERPOS FRENTE A $\alpha$ -CRISTALINA

El grado de respuesta de los pacientes y controles frente a la  $\alpha$ -cristalina (entendido como niveles de autoanticuerpos frente a esta proteína), ha tenido que determinarse mediante una recta patrón, que ha hecho posible la comparación entre las diferentes muestras. Dado que no existen sueros internacionales de referencia para anticuerpos contra  $\alpha$ -cristalina, se tuvo que construir la recta patrón, empleando el suero más positivo frente a la  $\alpha$ -cristalina como suero de referencia (como se ha indicado en el apartado 3.6 de materiales y métodos) y la calibración se ha realizado en unidades relativas (UR), asignando a cada muestra su valor correspondiente de UR al interpolar en la recta patrón el valor de su densidad óptica.

La recta patrón que se obtuvo fue la siguiente:  $y = 0,041x + 0,329$ , el coeficiente de correlación fue  $r = 0,953$  (ver figura 19).



**Figura 19.** Recta patrón, gracias a la cual se ha podido calcular la positividad relativa de los sueros de pacientes con uveítis y de controles, frente a la proteína  $\alpha$ -cristalina.

Los valores de cada individuo control y de cada paciente, expresados en unidades relativas, se muestran a continuación (ver tabla 17). La especificidad de los autoanticuerpos presentes en el suero de los individuos frente a  $\alpha$ -cristalina, fue comprobada mediante la realización de un western blot (ver figura 20).

Los resultados de los sueros analizados, fueron considerados positivos cuando la medida obtenida fue superior a la media de sanos ( $\bar{x}_{\text{sanos}} = 8,19$  UR) más el triple de la desviación estándar (desviación = 5,4).

$$\bar{x} + 3ds = 24,3 \text{ UR}$$

Es decir, cualquier suero cuyas UR fueran superiores a 24,3 fue considerado positivo.

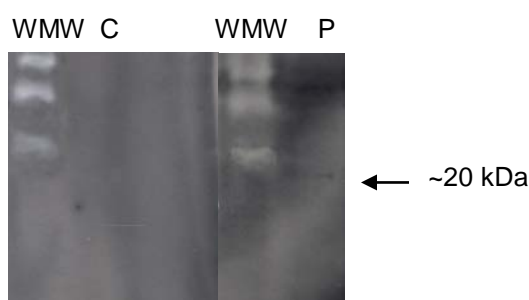


Controles	UR
1'	6,89
2'	10,10
3'	15,36
4'	5,59
5'	8,90
6'	11,50
7'	4,39
8'	16,66
9'	2,51
10'	0
11'	36,09*

Pacientes	UR
1	13,50
2	4,56
3	4,64
4	12,91
5	26,61*
6	6,38
7	24,48*
8	3,19
9	14,31
10	18,06
11	27,41*

**Tabla 17.** Unidades relativas de cada individuo control y de cada paciente con uveítis.

\* Individuos positivos para la presencia de autoanticuerpos frente a  $\alpha$ -cristalina.



**Figura 20.** Western blot de un individuo control y de un paciente con uveítis. En el carril del paciente se observa una banda con el tamaño correspondiente para la  $\alpha$ -cristalina, que está ausente en el carril del individuo control. Este dato nos indica la presencia de autoanticuerpos específicos para esta proteína en el suero del paciente. WMW: patrón de peso molecular, C: control, P: paciente.

Tres pacientes y un control presentaron resultados positivos para la presencia de autoanticuerpos frente a  $\alpha$ -cristalina y no se encontró ninguna característica común entre los tres pacientes: uno presentaba panuveítis y era HIV+, otro uveítis anterior aguda y el tercero uveítis anterior aguda recurrente.

## **5. DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC

La IBD es un desorden inflamatorio crónico del tracto digestivo, e incluye dos entidades: EC y UC (Schreiber, Raedler, Stenson, & MaECermott, 1992). Varios genes se han implicado en la aparición de estas patologías y recientemente varios polimorfismos en el gen CARD15 se han implicado en la susceptibilidad a sufrir EC. Puesto que algunos pacientes con EC pueden presentar uveítis y que la permeabilidad intestinal alterada, un rasgo presente en EC, se ha puesto de manifiesto también la uveítis (Banares et al., 1995), se encontró oportuno analizar el estado de los polimorfismos de CARD15 asociados a susceptibilidad a padecer EC en un grupo de pacientes con uveítis.

No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los marcadores analizados (P268S, R702W, G908R, 1007fs) entre los pacientes y los individuos control. Tampoco se encontraron diferencias en el número de individuos portadores de más de uno de los polimorfismos estudiados: ocho pacientes y doce individuos control presentaron dos mutaciones y ningún individuo presentó más de dos mutaciones.

Dado que la uveítis puede, en algunas ocasiones, manifestarse con enfermedades crónicas concomitantes (espondiloartropatía, enfermedad de Behçet,...) se analizó también cualquier diferencia que pudiera estar relacionada con la presencia de los polimorfismos estudiados entre el grupo de pacientes con manifestaciones sistémicas (n=27) y el grupo que carecía de ellas (n=84). Pero nuevamente no se hallaron diferencias en la frecuencia de los marcadores entre ambos grupos. Puesto que 57 de los 111 pacientes con uveítis presentaron al menos un polimorfismo asociado

a susceptibilidad a sufrir EC, se determinó la frecuencia con la que EC se presentaba en nuestra cohorte de pacientes. Sólo cuatro pacientes presentaban esta patología y de ellos, sólo dos portaron un polimorfismo predisponente a EC (P268S en heterocigosis). Por tanto, las mutaciones en esta región no parecen estar implicadas en el desarrollo de las uveítis idiopáticas. Este resultado encaja con el conocimiento actual que se tiene sobre la implicación de los alelos mutados de CARD15 en la susceptibilidad a EC: estos alelos no son suficientes ni necesarios para desarrollar la enfermedad, ya que las mutaciones se han encontrado en el 0,5%-2% de la población general y un 60%-70% de los pacientes con EC no muestran mutaciones en CARD15 (Eckmann & Karin, 2005). Los resultados, considerados en conjunto, sugieren que los polimorfismos del gen CARD15 que predisponen a EC, no están ligados a uveítis.

En otras patologías inflamatorias en las que se ha estudiado el papel de este gen se han encontrado resultados similares; es este el caso de la espondilitis anquilosante (van der Paardt et al., 2003), la periodontitis agresiva (Noack, Gorgens, Hoffmann, & Schackert, 2006) o enfermedad de Behçet (Ahmad et al., 2005)(Uyar, Saruhan-Direskeneli, & Gul, 2004), donde no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de las mutaciones en CARD15 entre pacientes y controles. Adicionalmente, un estudio llevado a cabo en 52 pacientes con sarcoidosis, concluyó que la uveítis, un rasgo que puede aparecer en algunos, aunque no en todos los pacientes con sarcoidosis, no estaba ligada a polimorfismos en CARD15 (Martin et al., 2003).

### ANÁLISIS DE LAS REGIONES 5' Y 3' ADYACENTES AL EXÓN 11

En lo referente a las regiones adyacentes al exón 11, el hecho de que los individuos que presentaran una transición A/T en la región 5', presentaran simultáneamente también una transición C/A en la región 3', es un rasgo a tener en cuenta, por su posible implicación en el procesamiento (splicing) del ARNm en esta región. Por ello, llevamos a

cabo un análisis de las secuencias de ADN, para determinar si estos cambios tenían algún efecto sobre la estructura exón/intrón del gen o sobre la generación de nuevos sitios de splicing.

Análisis llevados a cabo con las aplicaciones GENSCAN (<http://geness.mit.edu/GENSCAN.html>), FCG-NESH ([http:// www.softberry.com/berry.phtml](http://www.softberry.com/berry.phtml)) y GAIL (<http://grail.lsd.oxl.gov/grailxp/>), sugirieron que estos polimorfismos no inducían ningún cambio. No obstante, hasta realizar futuros experimentos, no podemos descartar que estos cambios tengan alguna consecuencia ya que la transición A/T puede afectar al denominado “branch point”, una adenosina localizada entre 20 y 50 bases del sitio de splicing, lugar importante para la formación del “lariat” durante el correcto splicing del ARNm.

## 5.2 POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER SB

Éste es el primer estudio realizado en población española para determinar la frecuencia de los polimorfismos en CARD15 asociados a susceptibilidad a padecer SB. Los datos aquí mostrados servirán para completar datos sobre la frecuencia poblacional de estos polimorfismos, y pueden ser útiles para futuros trabajos.

No se ha detectado en pacientes ni en controles, ninguno de los polimorfismos asociados a SB. Por tanto, los resultados revelan que los principales polimorfismos implicados en SB no están asociados con la susceptibilidad a padecer uveítis idiopática. Esto sugiere que la etiología génica de la uveítis asociada a Blau es diferente de la uveítis idiopática. Este hallazgo indica que, probablemente otros genes pueden ser más relevantes en este tipo de uveítis y de hecho, varios trabajos en la literatura han destacado la implicación del sistema MHC (HLA-B27 se ha asociado con dicha enfermedad) o los genes de citoquinas (Martin & Rosenbaum, 2005).

Nuestros resultados coinciden con datos publicados con anterioridad (Martin et al., 2003) que mostraban una falta de asociación entre las mutaciones de CARD15 y la uveítis en un grupo de pacientes con sarcoidosis. Sin embargo, resultados recientes utilizando un modelo murino (Rosenzweig et al., 2008), muestran que CARD15 es el gen implicado en la susceptibilidad a padecer uveítis granulomatosa. Esta discrepancia con nuestros datos, puede ser explicada por la diferencia existente entre un modelo animal y estudios en humanos; tanto en la carga antigénica, como en la constitución genética por lo que a CARD15 respecta. Así, en el modelo animal usado, se inyectó intraocularmente MDP en ratones que además, no expresaban (knock-out) CARD15. Sin embargo, nuestro trabajo estaba encaminado a analizar mutaciones puntuales (y no ausencia) del gen en pacientes con uveítis idiopática (en las que no se inyectó intraocularmente antígeno alguno).

Diferentes condiciones inflamatorias se han asociado a mutaciones del gen CARD15. EC está ligada a cambios que afectan al dominio LRR de la proteína Nod2 (Lesage et al., 2002), alterando la habilidad de la molécula para detectar el MDP de patógenos en sangre, lo que, finalmente, conlleva a un aumento de la activación de NF- $\kappa$ B. Por otro lado, los tres polimorfismos más frecuentes asociados a SB están localizados en el dominio NBD de la proteína, una región diferente de la molécula. Estos polimorfismos no afectan a la capacidad de reconocimiento de las células pero, sin embargo, llevan también a un aumento de la activación de NF- $\kappa$ B.

Es destacable el hecho de que todas las condiciones inflamatorias que muestran un fuerte ligamiento con los polimorfismos de CARD15 (SB, EC y sarcoidosis de inicio temprano) (Kambe, Nishikomori, & Kanazawa, 2005) muestran la formación de granulomas como un rasgo clínico destacado. Sin embargo, otras condiciones inflamatorias que no han mostrado ninguna asociación con CARD15 o una asociación débil, como la colitis ulcerosa (Lesage et al., 2002), artritis reumatoide, espondilitis

anquilosante, diabetes de tipo I o lupus eritematoso sistémico (Henckaerts & Vermeire, 2007), no poseen este rasgo clínico.

En el presente estudio se muestra información sobre otra condición inflamatoria (uveítis idiopática) que no está asociada con la formación de granulomas y que tampoco presenta ningún ligamiento con el gen CARD15, ya sea en el dominio NBD como en el dominio LRR analizados. Esto parece sugerir que sería posible que los polimorfismos de CARD15 descritos hasta el momento en estas regiones, pudiesen estar implicados en la formación de granulomas más que en la susceptibilidad a sufrir inflamación. La distribución tisular de la proteína Nod2 (en macrófagos) apoya esta hipótesis, ya que estas células son cruciales en el desarrollo de granulomas, pues la continua activación de los macrófagos y el aumento en la actividad de NF- $\kappa$ B puede llevar a la formación de granulomas. Es cierto que otras patologías, como tumores (Henckaerts & Vermeire, 2007) o la enfermedad de injerto contra huésped (GvH, Graft-versus-Host) en transplantes de células madre (Granell et al., 2006), han sido ligadas a mutaciones en el gen CARD15 y sin embargo, ninguna de ellas ha mostrado formación de granulomas. Este hallazgo parecería contraponerse a la afirmación anterior, pero conviene reseñar que dichas patologías no son condiciones autoinflamatorias y esto implica que, tal vez CARD15, pueda no estar jugando un papel en la formación de granulomas en estas condiciones clínicas.

### **5.3. POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC Y SB EN PACIENTES CON UVEÍTIS INFECCIOSAS**

El hecho de que en las uveítis infecciosas la inflamación de la úvea se desarrolle tras una infección ocular, tras la exposición a un patógeno, de manera similar a como se ha propuesto para EC, hace que este tipo de uveítis pueda ser un modelo adecuado para estudiar la implicación del gen CARD15 en el desarrollo de una inflamación post-infecciosa.

Nuestros resultados rechazan la hipótesis de que los polimorfismos de CARD15 asociados a EC, analizados en el presente trabajo, están implicados en la inflamación ocular que se desarrolla en la uveítis infecciosa. Una explicación para esta discrepancia, en línea con otros estudios que tampoco mostraron una asociación entre los polimorfismos y otras condiciones inflamatorias, como la espondilitis anquilosante (van der Paardt et al., 2003) o la periodontitis agresiva (Noack et al., 2006), es la diferente naturaleza de los patógenos implicados en el desarrollo de la uveítis infecciosa. De hecho, en nuestra cohorte de pacientes la infección fue causada tanto por toxoplasma como por herpesvirus, que no poseen MDP en su superficie y probablemente de esta manera, no son reconocidos por el dominio LRR de la molécula CARD15. Esto sugiere que otros genes deben estar implicados en su reconocimiento, desencadenando la correspondiente respuesta inflamatoria.

Por otro lado, se abordó el análisis de los polimorfismos asociados a SB en estos pacientes, porque los pacientes con este síndrome manifiestan uveítis y datos recientes han mostrado que estas mutaciones están asociadas con un defecto en la eliminación de patógenos intracelulares (Kim et al., 2007). Sin embargo, no se presentaron mutaciones asociadas a padecer SB en ninguno de los individuos estudiados, lo cual indica que no están implicadas en el desarrollo de la uveítis infecciosa. Esto indica la posibilidad de que otros receptores aparte de CARD15, tales como TLRs, estén implicados en el reconocimiento de patógenos y en el inicio de reacciones frente a los patógenos en pacientes con uveítis infecciosa. Adicionalmente, el papel de las citoquinas secretadas localmente, con potentes propiedades proinflamatorias, debe de ser también tenido en cuenta. La posible implicación de la ruta de NF- $\kappa$ B en la inflamación observada en la uveítis infecciosa (dado que la producción local de IFN $\gamma$  está mediada por este factor nuclear), sugiere que otros genes distintos de CARD15 están implicados en esta ruta.

Estos resultados se han obtenido con una cohorte de pacientes limitada. Sin embargo, la uveítis infecciosa es escasa cuando se compara



con la frecuencia de las uveítis no infecciosas; esto explica el bajo número de pacientes aquí presentado. Deberían conseguirse muestras procedentes de diversos hospitales, con el objetivo de aumentar el tamaño muestral.

El hecho de que la frecuencia de los polimorfismos estudiados en pacientes con uveítis no difiera de la del grupo de individuos control, no implica que el gen CARD15 no sea responsable de la susceptibilidad a presentar uveítis, ya que otras regiones del mismo podrían estar implicadas.

#### **5.4. POLIMORFISMOS ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A PADECER EC EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

Los resultados del presente trabajo, rechazan la hipótesis de que los polimorfismos de CARD15 asociados a EC, estén implicados de alguna manera en el adenocarcinoma gástrico. Aunque el hecho de que estos polimorfismos estuvieran implicados en diversas alteraciones gástricas, podía sugerir que también lo estuvieran en el adenocarcinoma gástrico, dado que esta patología también desencadena una afectación gástrica. Nuestros resultados, discrepan de trabajos previamente publicados, pues Rosentien y colaboradores pusieron de manifiesto la asociación de las variantes R702W, G908R y L1007fs en CARD15 con la evolución clínica tras la infección por *Helicobacter pylori* en linfoma gástrico MALT (Rosenstiel et al., 2006). La discrepancia entre nuestros resultados y los publicados, puede deberse a varios motivos. La diferencia en tamaño muestral puede ser una de las causas; en el presente trabajo sólo se analizó una pequeña muestra de 26 pacientes, muestras que en el trabajo antes mencionado, se estudiaron pacientes, sería pues necesario aumentar el número de pacientes estudiados para alcanzar conclusiones sólidas. Además, el trabajo de Rosentiel, encuentra una asociación entre el polimorfismo R702W y el desarrollo de linfoma gástrico, mientras que los pacientes estudiados en nuestro trabajo presentan adenocarcinoma

gástrico, una patología diferente, esto puede explicar la discrepancia de resultados.

### **5.5. AUTOANTICUERPOS FRENTE A $\alpha$ -CRISTALINA**

Los resultados descartan cualquier asociación entre la uveítis y los niveles de autoanticuerpos frente a la proteína  $\alpha$ -cristalina, a diferencia de lo que proponen otros estudios en población alemana (Doycheva et al., 2007). Pues los resultados obtenidos en el presente trabajo, no mostraron una mayor incidencia de pacientes con mayores niveles de autoanticuerpos (3 de un total de 11) respecto al grupo control (1 de 11). Mientras que en el trabajo de Doycheva y colaboradores, la incidencia de estos anticuerpos fue del 36% (59 de un total de 165) en los pacientes y 12% (13 de 112) en sanos. Esta ligera discrepancia, entre ambos trabajos, a pesar de haber empleado metodologías similares (ELISA), puede ser debida a que nuestros resultados se han obtenido con una cohorte de pacientes limitada, que debería de ser aumentada para conseguir una mayor robustez de los resultados. En este sentido, dichos resultados son más similares a los obtenidos por Patel et al. (Patel, Shine & Murray, 1990), aunque en este caso la metodología usada es distinta (partículas de celulosa).

A pesar de los datos publicados, no queda clara la implicación clínica de estos autoanticuerpos en pacientes con uveítis, si es que tiene alguna. Se desconoce si los autoanticuerpos tienen un papel patogénico o una función protectora en la uveitogénesis. Además, pueden ser el resultado del desarrollo de la catarata como una complicación de la uveítis. De hecho, se han encontrado autoanticuerpos frente a proteínas de la lente en pacientes con cataratas, por lo que se propone que la aparición de autoanticuerpos pueda ser un fenómeno secundario al escape de cristalinas de la lente. Con lo que podría ser pertinente el estudio de la presencia de autoanticuerpos en pacientes con uveítis en función de la aparición o no de cataratas a lo largo de la evolución clínica.

## **6. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

Nuestros resultados no nos han permitido encontrar un marcador diferencial de uveítis idiopática, con respecto al grupo control, de entre los polimorfismos considerados (asociados a susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn y síndrome de Blau). Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio sobre el gen CARD15 en uveítis idiopática.

Nuestros datos sugieren que ninguno de los polimorfismos en CARD15 asociados a susceptibilidad a padecer EC y SB, parece estar implicado en la patogénesis de la uveítis infecciosa. Sin embargo, para alcanzar unas conclusiones estadísticas más robustas, se requeriría aumentar el número de pacientes. Esto implica una cooperación multicéntrica, que permitiría reunir el número adecuado de pacientes con uveítis idiopática.

Se ha descrito dos nuevos polimorfismos intrónicos que se presentan de manera simultánea, uno en la región 5' adyacente al exón 11 y el otro en la región 3' adyacente al exón 11 del gen CARD15.

Se ha descrito un polimorfismo en el exón 7 para *Homo sapiens*, que sólo había sido descrito anteriormente en el primate *Hylobates lar*.

Se ha puesto a punto una técnica de detección de autoanticuerpos frente a  $\alpha$ -cristalina presentes en el suero de individuos control y de pacientes con uveítis, que ha permitido determinar la falta de asociación entre la uveítis y los niveles de autoanticuerpos frente a la proteína  $\alpha$ -cristalina.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, C., & Cho, J. H. (2006). Functional consequences of NOD2 (CARD15) mutations. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12(7), 641-650.
- Abu El-Asrar, A. M., Struyf, S., Descamps, F. J., Al-Obeidan, S. A., Proost, P., Van Damme, J., et al. (2004). Chemokines and gelatinases in the aqueous humor of patients with active uveitis. *American Journal of Ophthalmology*, 138(3), 401-411.
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., & Meyer, R. B. (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Research*, 25(13), 2657-2660.
- Ahmad, T., Zhang, L., Gogus, F., Verity, D., Wallace, G., Madanat, W., et al. (2005). CARD15 polymorphisms in behcet's disease. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 34(3), 233-237.
- Banares, A. A., Jover, J. A., Fernandez-Gutierrez, B., Benitez del Castillo, J. M., Garcia, J., Gonzalez, F., et al. (1995). Bowel inflammation in anterior uveitis and spondyloarthropathy. *The Journal of Rheumatology*, 22(6), 1112-1117.
- Becker, M. L., & Rose, C. D. (2005). Blau syndrome and related genetic disorders causing childhood arthritis. *Current Rheumatology Reports*, 7(6), 427-433.
- Bonen, D. K., & Cho, J. H. (2003). The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 124(2), 521-536.
- Doycheva, D., Preuss, B., Klein, R., & Zierhut, M. (2007). High incidence of antibodies to lens proteins in sera from patients with uveitis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 245(5), 683-688.
- Dubin, R. A.; Ally, A. H.; Chung, S.; Piatigorsky, J. (1990). Human alpha-B-crystallin gene and preferential promoter function in lens. *Genomics*, 7, 594-601.

- Eckmann, L., & Karin, M. (2005). NOD2 and crohn's disease: Loss or gain of function? *Immunity*, 22(6), 661-667.
- Falappone, P. C., Iannone, F., Scioscia, C., Grattagliano, V., Covelli, M., & Lapadula, G. (2004). The treatment of recurrent uveitis with TNF-alpha inhibitors. [Il trattamento delle uveiti recidivanti con inibitori del TNFalfa] *Reumatismo*, 56(3), 185-189.
- Föster, V. T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics*, 2, 55-75.
- Franchi, L., Park, J. H., Shaw, M. H., Marina-Garcia, N., Chen, G., Kim, Y. G., et al. (2008). Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cellular Microbiology*, 10(1), 1-8.
- Fujisawa, M., Kiyosue, M., Hori, M., & Ozaki, H. (2006). Identification of Card15/Nod2 mRNA in intestinal tissue of experimentally induced colitis in rats. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 68(7), 701-708.
- Ghanchi, F. D., & Rembacken, B. J. (2003). Inflammatory bowel disease and the eye. *Survey of Ophthalmology*, 48(6), 663-676.
- Granell, M., Urbano-Ispizua, A., Arostegui, J. I., Fernandez-Aviles, F., Martinez, C., Rovira, M., et al. (2006). Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 91(10), 1372-1376.
- Guo, Q. S., Xia, B., Jiang, Y., Qu, Y., & Li, J. (2004). NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in chinese patients of han nationality. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 10(7), 1069-1071.
- Henckaerts, L., & Vermeire, S. (2007). NOD2/CARD15 disease associations other than crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(2), 235-241.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., et al. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 599-603.

- Hugot, J. P., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Olson, J. M., Lee, J. C., Beaugerie, L., et al. (1996). Mapping of a susceptibility locus for crohn's disease on chromosome 16. *Nature*, 379(6568), 821-823.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., et al. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. implications for crohn's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5509-5512.
- Inohara, N., Ogura, Y., & Nunez, G. (2002). Nods: A family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 5(1), 76-80.
- Inoue, N., Tamura, K., Kinouchi, Y., Fukuda, Y., Takahashi, S., Ogura, Y., et al. (2002). Lack of common NOD2 variants in japanese patients with crohn's disease. *Gastroenterology*, 123(1), 86-91.
- Jabs, D. A., Nussenblatt, R. B., Rosenbaum, J. T., & Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group. (2005). Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. results of the first international workshop. *American Journal of Ophthalmology*, 140(3), 509-516.
- Jabs, D. A., Rosenbaum, J. T., Foster, C. S., Holland, G. N., Jaffe, G. J., Louie, J. S., et al. (2000). Guidelines for the use of immunosuppressive drugs in patients with ocular inflammatory disorders: Recommendations of an expert panel. *American Journal of Ophthalmology*, 130(4), 492-513.
- Japanese Gastric Cancer, A. (1998). Japanese classification of gastric carcinoma - 2nd english edition -. *Gastric Cancer : Official Journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 1(1), 10-24.
- Kambe, N., Nishikomori, R., & Kanazawa, N. (2005). The cytosolic pattern-recognition receptor Nod2 and inflammatory granulomatous disorders. *Journal of Dermatological Science*, 39(2), 71-80.



- Kanski, J. J. (1992). *Uveítis. diagnóstico y tratamiento en color*. (T. Sánchez-Minguet Martínez, J. M. Granados Centeno & M. Gómez García Trans.). Madrid: Marbán, S.A.
- Kim, T. H., Payne, U., Zhang, X., Iwanaga, Y., Davey, M. P., Rosenbaum, J. T., et al. (2007). Altered host:Pathogen interactions conferred by the blau syndrome mutation of NOD2. *Rheumatology International*, 27(3), 257-262.
- Kurokawa, T., Kikuchi, T., Ohta, K., Imai, H., & Yoshimura, N. (2003). Ocular manifestations in blau syndrome associated with a CARD15/Nod2 mutation. *Ophthalmology*, 110(10), 2040-2044.
- Kutyavin, I. V., Lukhtanov, E. A., Gamper, H. B., & Meyer, R. B. (1997). Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: Base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Research*, 25(18), 3718-3723.
- Lakowicz, J. R. (1983). Energy Transfer. In: Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York: Plenum Press 303-339.
- Lesage, S., Zouali, H., Cezard, J. P., Colombel, J. F., Belaiche, J., Almer, S., et al. (2002). CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *American Journal of Human Genetics*, 70(4), 845-857.
- Leung, E., Hong, J., Fraser, A., & Krissansen, G. W. (2007). Splicing of NOD2 (CARD15) RNA transcripts. *Molecular Immunology*, 44(4), 284-294.
- Li, J., Moran, T., Swanson, E., Julian, C., Harris, J., Bonen, D. K., et al. (2004). Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Human Molecular Genetics*, 13(16), 1715-1725.
- Martin, T. M., Doyle, T. M., Smith, J. R., Dinulescu, D., Rust, K., & Rosenbaum, J. T. (2003). Uveitis in patients with sarcoidosis is not associated with mutations in NOD2 (CARD15). *American Journal of Ophthalmology*, 136(5), 933-935.

- Martin, T. M., & Rosenbaum, J. T. (2005). Genetics in uveitis. *International Ophthalmology Clinics*, 45(2), 15-30.
- McGovern, D. P., van Heel, D. A., Ahmad, T., & Jewell, D. P. (2001). NOD2 (CARD15), the first susceptibility gene for crohn's disease. *Gut*, 49(6), 752-754.
- Medzhitov, R. (2004). The innate immune system. *Fundamental immunology*. (Fifth edition ed., pp. 497). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Merck, K. B., de Haard-Hoekman, W. A., Cruysberg, J. R., Bloemendal, H., & de Jong, W. W. (1993). Characterization of anti-crystallin autoantibodies in patients with cataract. *Molecular Biology Reports*, 17(2), 93-99.
- Miceli-Richard, C., Lesage, S., Rybojad, M., Prieur, A. M., Manouvrier-Hanu, S., Hafner, R., et al. (2001). CARD15 mutations in blau syndrome. *Nature Genetics*, 29(1), 19-20.
- Michalova, K., & Lim, L. (2008). Biologic agents in the management of inflammatory eye diseases. *Current Allergy and Asthma Reports*, 8(4), 339-347.
- Munoz-Fernandez, S., & Martin-Mola, E. (2006). Uveitis. *Best Practice & Research.Clinical Rheumatology*, 20(3), 487-505.
- Noack, B., Gorgens, H., Hoffmann, T., & Schackert, H. K. (2006). CARD15 gene variants in aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(11), 779-783.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., et al. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to crohn's disease. *Nature*, 411(6837), 603-606.
- Patel, M., Shine, B., Murray, P.I. (1990). Antilens antibodies in cataract and inflammatory eye disease: an evaluation of a new technique. *International Ophtalmology*, 14, 97-100.
- Rosenstiel, P., Hellmig, S., Hampe, J., Ott, S., Till, A., Fischbach, W., et al. (2006). Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on

- the clinical outcome of helicobacter pylori infection. *Cellular Microbiology*, 8(7), 1188-1198.
- Rosenzweig, H. L., Martin, T. M., Jann, M. M., Planck, S. R., Davey, M. P., Kobayashi, K., et al. (2008). NOD2, the gene responsible for familial granulomatous uveitis, in a mouse model of uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(4), 1518-1524.
- Russell, R. K., Wilson, D. C., & Satsangi, J. (2004). Unravelling the complex genetics of inflammatory bowel disease. *Archives of Disease in Childhood*, 89(7), 598-603.
- Schreiber, S., Raedler, A., Stenson, W. F., & MacDermott, R. P. (1992). The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 21(2), 451-502.
- Smit, R. L., Baarsma, G. S., & de Vries, J. (1993). Classification of 750 consecutive uveitis patients in the rotterdam eye hospital. *International Ophthalmology*, 17(2), 71-76.
- Sobin, L. H., & Fleming, I. D. (1997). TNM classification of malignant tumors, fifth edition (1997). union internationale contre le cancer and the american joint committee on cancer. *Cancer*, 80(9), 1803-1804.
- Strober, W., Murray, P. J., Kitani, A., & Watanabe, T. (2006). Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature Reviews.Immunology*, 6(1), 9-20.
- Takase, H., Futagami, Y., Yoshida, T., Kamo, K., Sugita, S., Imai, Y., et al. (2006). Cytokine profile in aqueous humor and sera of patients with infectious or noninfectious uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(4), 1557-1561.
- Tanabe, T., Chamaillard, M., Ogura, Y., Zhu, L., Qiu, S., Masumoto, J., et al. (2004). Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *The EMBO Journal*, 23(7), 1587-1597.

- Torkvist, L., Noble, C. L., Lordal, M., Sjoqvist, U., Lindforss, U., Nimmo, E. R., et al. (2006). Contribution of CARD15 variants in determining susceptibility to crohn's disease in sweden. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41(6), 700-705.
- Uyar, F. A., Saruhan-Direskeneli, G., & Gul, A. (2004). Common crohn's disease-predisposing variants of the CARD15/NOD2 gene are not associated with behcet's disease in turkey. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 22(4 Suppl 34), S50-2.
- van der Paardt, M., Crusius, J. B., de Koning, M. H., Murillo, L. S., van de Stadt, R. J., Dijkmans, B. A., et al. (2003). CARD15 gene mutations are not associated with ankylosing spondylitis. *Genes and Immunity*, 4(1), 77-78.
- van Duist, M. M., Albrecht, M., Podswiadek, M., Giachino, D., Lengauer, T., Punzi, L., et al. (2005). A new CARD15 mutation in blau syndrome. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 13(6), 742-747.

**ANEXO**

## PUBLICACIONES

### **1. Analysis of Crohn's disease-related CARD15 polymorphisms in Spanish patients with idiopathic uveitis** (Disease Markers. 2008 Mes 24:111-117).

We wished to analyse the frequency of Crohn's disease-linked CARD15 polymorphisms (P268S, R702W, G908R and 1007fs) in a group of Spanish patients with idiopathic uveitis. To this aim, DNA samples were obtained from 111 unrelated patients. P268S, R702W and G908R polymorphisms were detected using TaqMan Genotyping kits (Applied Biosystems), and the 1007fs variation by direct DNA sequencing. Control group consisted of 105 healthy subjects. None of the polymorphisms studied revealed a significant increase in the groups of patients, when compared to the control group. Thus, P268S is found in 50% of patients (gene frequency 0.284) vs 44% of control individuals (gene frequency 0.245); R702W in 7% of patients (0.036) vs 7% (0.033); G908R in 2% of patients (0.009) vs 4% (0.019) and, finally, 1007 fs in 2% of uveitis patients (0.008) vs 4% (0.021). Moreover, DNA sequencing has allowed us to define two new intronic polymorphisms in phase, in the 5' and 3' boundaries of the exon 11 (GenBank accession number #DQ 869189). Altogether, our results suggest that the Crohn's disease-linked CARD15 polymorphisms do not seem to predispose to idiopathic uveitis in the Spanish population.

### **2. Blau syndrome-related CARD15 mutations are not linked to idiopathic uveitis in spanish patients**(En prensa en Disease Markers. 2009)

Uveitis is a clinical feature of the Blau syndrome, a disease linked to CARD15 mutations. Three main mutations in this gene (R334W, R334Q and L469F) have been reported as Blau syndrome risk factors. However, little is known on the involvement of this gene in idiopathic uveitis. We thus sought to determine the frequency of these Blau-related CARD15 mutations in a cohort of Spanish patients with idiopathic uveitis. To this aim, one hundred and ten patients with idiopathic uveitis, followed at the Department of Ophtalmology of a tertiary hospital (Hospital Universitario Alcalá de Henares, Madrid. Spain) were enrolled. As a control population, 105 healthy subjects were used. DNA was extracted from blood samples and the Blau-related CARD15 polymorphisms were analysed either by PCR-RFLP or direct DNA sequencing. None of the polymorphisms studied was found in any of the individuals tested, whether diseased or healthy. It seems thus that Blau syndrome-related CARD15 mutations are not involved in idiopathic uveitis, a finding which allows us to suggest that the genetic aetiology of the idiopathic uveitis or the Blau-associated uveitis is different

# Analysis of Crohn's disease-related CARD15 polymorphisms in Spanish patients with idiopathic uveitis

N. Rodríguez-Pérez<sup>a</sup>, A. Aguinaga-Barrilero<sup>a</sup>, Marina B. Gorroño-Echebarría<sup>b</sup>,  
Mercedes Pérez-Blas<sup>a</sup> and J. M. Martín-Villa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain*

<sup>b</sup>*Servicio de Oftalmología, Hospital Universitario "Príncipe de Asturias", Alcalá de Henares, Madrid, Spain*

**Abstract.** We wished to analyse the frequency of Crohn's disease-linked CARD15 polymorphisms (P268S, R702W, G908R and 1007fs) in a group of Spanish patients with idiopathic uveitis. To this aim, DNA samples were obtained from 111 unrelated patients. P268S, R702W and G908R polymorphisms were detected using TaqMan Genotyping kits (Applied Biosystems), and the 1007fs variation by direct DNA sequencing. Control group consisted of 105 healthy subjects.

None of the polymorphisms studied revealed a significant increase in the groups of patients, when compared to the control group. Thus, P268S is found in 50% of patients (gene frequency 0.284) vs 44% of control individuals (gene frequency 0.245); R702W in 7% of patients (0.036) vs 7% (0.033); G908R in 2% of patients (0.009) vs 4% (0.019) and, finally, 1007fs in 2% of uveitis patients (0.008) vs 4% (0.021). Moreover, DNA sequencing has allowed us to define two new intronic polymorphisms in phase, in the 5' and 3' boundaries of the exon 11 (GenBank accession number #DQ 869189).

Altogether, our results suggest that the Crohn's disease-linked CARD15 polymorphisms do not seem to predispose to idiopathic uveitis in the Spanish population.

Keywords: Uveitis, CARD15, SNPs

## 1. Introduction

Idiopathic uveitis (uveitides) encompasses a group of inflammatory conditions (immune-mediated) affecting mainly the uveal tract of the eye, which is the middle layer of the eye, between the sclera, conjunctiva and the anterior chamber on the outside, and the retina on the inside [15]. Depending on the anatomic part of the eye affected, idiopathic uveitis can be classified in anterior, intermediate or posterior uveitis, and panuveitis (affecting the anterior chamber, vitreous and retina or choroids). Annual incidence in Western countries is

approximately 17/100,000, and the prevalence is estimated to be 38/100,000 [20]. Although its etiology is not well understood both, genetic and environmental factors, seem to play key roles in the disease appearance. The genetics of idiopathic uveitis remains unknown and several genes have been involved: major histocompatibility complex (HLA-B27), cytokine gene polymorphism or chemokine receptors genes [12].

Many uveitic entities are associated with systemic auto-immune or inflammatory diseases, such as inflammatory bowel disease (IBD). Ocular manifestations are not uncommon in IBD patients, with an incidence spanning between 4 and 12%. Amongst them the most frequent are uveitis, episcleritis and scleritis [6]. Interestingly, altered intestinal permeability, a feature of IBD, has also been reported in uveitis, suggesting that either the intestinal mucosa or its lymphoid tissue may be implicated in the pathogenesis of uveitis [2].

\*Corresponding author: Prof. J.M. Martín-Villa, Inmunología, Facultad de Medicina, Pabellón V, planta 4<sup>a</sup>, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 913941642; Fax: +34 913941641; E-mail: autoinmunidad@med.ucm.es.

Susceptibility to Crohn's disease (CD), one of the forms of IBD, has been linked to variations in the caspase recruitment domain (CARD15) gene [7,18]. This gene encodes a cytosolic protein, termed nucleotide oligomerization domain 2 (Nod2), involved in intracellular detection of bacterial components (muramyl dipeptide, MDP). It is expressed mainly on monocytes, granulocytes and dendritic cells, and consists of several functional domains: two amino-terminal CARD domains, a central NOD domain and 10 carboxy-terminal leucine rich repeat (LRR) domains. The LRR domains are involved in the interaction with the infecting pathogen, whereas the CARD domains enable the protein to induce apoptosis and the NF- $\kappa$ B signalling pathways.

Three major CARD15 variants have been associated with susceptibility to CD [10]. These are a 2104 C  $\rightarrow$  T transition responsible for the R702W polymorphism where an arginine is replaced by a tryptophan (SNP accession number rs17860491, according to the SNP database at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), a transversion 2722 G  $\rightarrow$  C, that causes the G908R polymorphism, where a glycine is replaced by an arginine (rs2066845), and a C insertion at position 3020 (3020insC) of the coding sequence, which causes a frameshift leading to a premature stop codon in aminoacid 1007 (1007fs, rs5743293). These mutations lay at exons 4, 8 and 11, respectively, the two latter in the LRR domains of the molecule. An additional mutation, a 802 C  $\rightarrow$  T transition, yielding a proline to serine change at position 268 (P268S, rs2066842), is also associated with CD, although this variant was shown to occur in phase with the R702W, G908R and 1007fs mutations [7].

These protein variants are impaired in their ability to sense MPD, and, therefore are defective in mounting the adequate NF- $\kappa$ B-mediated response [8]. As a result, defects in the initial innate response to bacterial exposure result in increased susceptibility to inflammation [11].

Recognizing the association between CARD15 and an inflammatory condition (CD), we sought to analyse the four previously mentioned CD-linked CARD15 mutations in a large group of Spanish patients with idiopathic uveitis, another inflammatory condition.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Experimental subjects

Written consent was obtained from 111 unrelated Spanish patients with idiopathic uveitis, diagnosed ac-

cording to standardized criteria [9], and disclosed as follows: 70 were anterior uveitis (AU) patients, 19 intermediate uveitis (IU) and 22 posterior uveitis (PU). Table 1 shows the main features of the patients. The inclusion of patients in the group of idiopathic uveitis is irrespective of the anatomic part of the eye inflamed or of whether they present any concomitant inflammatory condition. Thus, in this regard, the group of patients is fairly homogeneous and can be confidently pooled. As a control group, 105 healthy volunteers (race-matched) were used. This research was approved by the Ethic Committee of the Institution.

### 2.2. DNA extraction

Blood samples were obtained by venopunction in EDTA-containing tubes. DNA was extracted by means of the DNAzol technique, according to the manufacturer's protocol (DNAzol reagent, Carlsbad, CA, USA).

### 2.3. Analysis of P268S, R702W and G908R polymorphisms

TaqMan SNP Genotyping Assay kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used for each mutation (references c\_11717468-20, c\_11717470-20 and c\_11717466-20, respectively), according to manufacturer's protocols, using an Applied Biosystems Real-Time PCR 7900 HT Fast System.

### 2.4. Analysis of the 1007fs polymorphism

This polymorphism was analysed by direct DNA sequencing. Exon 11 was amplified by PCR using previously published primers and conditions [10]. PCR amplification products were resolved in a 2% agarose gel, and the band of interest sliced, eluted from the gel (MiniElute Gel Extraction Kit, QIAGEN, Valencia, CA, USA) and submitted to the DNA sequencing facilities of the Universidad Complutense de Madrid (CAI de Genómica), where it was sequenced (direct sequencing) in an automated DNA sequencer. Both, forward and reverse amplifications from each sample were analysed to ensure the quality of the sequences.

Sequences from patients were compared to that of control group, as well as with previously published sequences of the CARD15 gene (GenBank #AJ303140).

Table 2 summarizes the methodology used.



Table 1  
Clinical features of the patients with idiopathic uveitis studied

Patients	<i>n</i> = 111
Age (mean; range)	42.6 yrs; 16–78 yrs
Sex M/F	53/58
Uveitis subtypes:	
Anterior uveitis	70
Intermediate uveitis	19
Posterior uveitis	22
Concomitant systemic inflammatory conditions:	
Crohn's disease	4
Spondyloarthritis	15
Behcet's Disease	3
Other (SLE, RA, fibromyalgia, etc. . . .)	10
Control individuals	<i>n</i> = 105

SLE, Systemic lupus erythematosus; RA, Rheumatoid arthritis.

Table 2  
Polymorphisms studied, localization and method of detection

EXON	DOMAIN	SNP	AMINOACID CHANGE	METHOD ANALYSIS
4	5' NOD boundary	802 C → T	P268S	TaqMan SNP
4	5' LRR1 boundary	2104 C → T	R702W	TaqMan SNP
8	LRR6	2722 G → C	G908R	TaqMan SNP
11	LRR10	3020insC	1007fs	DIRECT DNA SEQUENCING

Table 3  
Results obtained for the polymorphisms studied in the total group of patients with uveitis, and its subtypes

POLYMORPHISM	PATIENTS (N = 111; 70 AU, 19 IU, 22 PU) %/ allele frequency	CONTROL POPULATION (N = 105) %/ allele frequency	p VALUE
P268S	Total group 50% / 0.284 AU 57%; IU 47%; PU 32%	44% / 0.245	n.s.
R702W	Total group 7% / 0.036 AU 10%; IU 0%; PU 5%	7% / 0.033	n.s.
G908R	Total group 2% / 0.009 AU 1%; IU 0%; PU 5%	4% / 0.019	n.s.
1007fs*	Total group 2% / 0.008 AU 0%; IU 6%; PU 0%	4% / 0.021	n.s.
Positive for at least one of the above markers	Total group 51% AU 57%; IU 47%; PU 32%	43%	n.s.

Gene frequency was assessed by direct gene counting.

AU Anterior uveitis; IU Intermediate uveitis; PU Posterior uveitis

\*Only 62 patients (32 AU, 16 IU and 14 PU) and 70 healthy subjects were sequenced.

### 2.5. Allele frequency

Allele frequency of the polymorphisms considered was calculated by direct gene counting.

### 2.6. Statistical analysis

The frequency of the different polymorphisms in the group of patients was compared to that of the group of healthy subjects, using the Chi-squared with Yates' correction test, or Fisher exact probability test when needed. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

## 3. Results

Table 3 shows the results obtained. The frequencies found for the markers tested in the healthy group matches that previously reported in the Spanish [4,17] or European [10] population.

P268S polymorphism is found in 50% of patients (gene frequency 0.284) and in 44% of control subjects (gene frequency 0.245), a difference that is not statistically different. When the various subsets of uveitis are considered, once again no statistical differences are found when compared to the control group, although a higher frequency of the P268S change is found in AU

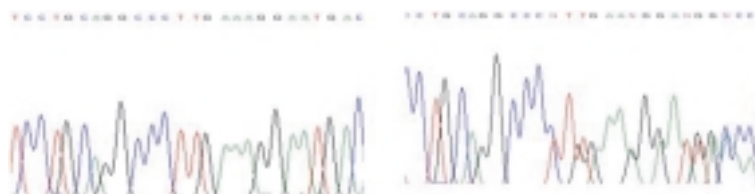


Fig. 1. Exon 11 sequence. Chromatogram depicts a homozygous individual lacking the 3020insC insertion (left) and a heterozygous individual with the insertion (right).

patients (57%,  $n = 70$ ), than in the IU group (47%,  $n = 19$ ) or the PU group (32%,  $n = 22$ ).

Regarding the R702W change, it is found in 7% of patients (0.036) and in 7% (0.033) of healthy individuals (n.s.). If the group of patients is disclosed, it is found in 10% of AU patients ( $n = 70$ ), 0% of IU patients ( $n = 19$ ) and 5% of PU patients ( $n = 22$ ).

As for the G908R SNP, it is found in roughly 2% of patients (0.009) and 4% (0.019) of control individuals (n.s.). If patients are analysed depending on the type of uveitis, this polymorphism is found in 1% of AU ( $n = 70$ ), 0% of IU ( $n = 19$ ) and 5% of PU patients ( $n = 22$ ).

The sequence of the exon 11 obtained in all subjects was identical to the consensus sequence previously published, except one patient ( $n = 62$ , 2%; 0.008) and three control individuals ( $n = 70$ , 4%; 0.021), in whom a cytosine insertion at position 3020 (3020insC) was found (Fig. 1, left). This insertion has been reported in 11% of patients with CD [10], in marked contrast to our group of uveitis patients, and in 2% of the control population [10], similar to our data. With regard to this polymorphism, our results resemble previously published data on ankylosing spondylitis [22].

Finally, positivity for any of the markers previously mentioned (i.e.: positive for at least one marker) was also considered and, as before, no difference was found between patients and control subjects (50% vs 43%,  $p$  n.s.).

Analysis of the 5' and 3' exon 11 flanking regions.

DNA sequencing has allowed us to study the 5' and 3' flanking regions of exon 11, which revealed an intronic polymorphism not previously described, at positions 128723 (5' end) and 128943 (3' end) (see Fig. 2A). Whereas most individuals present an A in homozygosis at position 128723, and a C at position 128943, 9 patients (15%) and 4 control subjects (6%,  $p$  n.s.), bear an A/T polymorphism in heterozygosis in the first position (see Fig. 2B) and, simultaneously, a C/A polymorphism, also in heterozygosis, in the second position (see Fig. 2C). No homozygous individuals for these changes were found. This new intronic poly-

morphism has been submitted to the GenBank, and the accession number #DQ869189 assigned.

#### 4. Discussion

IBD is a chronic inflammatory disorder of the digestive tract, and includes two entities: CD and ulcerative colitis (UC) [19], and several mutations at the CARD15 gene have been involved in the susceptibility to suffer CD. Given the fact that some IBD patients may present uveitis and that altered intestinal permeability, a feature present in CD, has been reported in uveitis [2], we wished to analyse the status of the CD-linked CARD15 gene mutations in a group of patients with uveitis.

No differences were found in the allele frequency of the markers tested (P268S, R702W, G908R, 1007fs) between patients and control subjects (Table 3), nor did it in the number of individuals carrying more than one mutation: eight patients and twelve control individuals presented two mutations, and no individual presented more than two mutations (data not shown).

Since uveitis may, in some instances, manifest with concomitant chronic diseases (spondyloarthropathy, Behcet's disease, etc. . . .), we next tested whether any difference with regard to the polymorphisms herein analysed existed between the group of patients with systemic manifestations ( $n = 27$ ) and those lacking them ( $n = 84$ ). Once again, we found no differences in the frequency of the markers between both groups (data not shown).

Given that 57 of the 111 patients with uveitis presented at least one CD-linked mutation, we were prompted to analyse what the frequency of CD was in our cohort. Only four patients suffer also from CD and, out of these, only two carried a CD-predisposing mutation (P268S, in heterozygosis). This result fits with our current knowledge that mutated CARD15 alleles are neither sufficient nor necessary for the development of CD, since mutations are found in 0.5%–2% of the general population, and 60%–70% of CD patients show no CARD15 mutations [5].



Fig. 2. Exon 11 5' and 3' flanking regions. a) Localization of the intronic polymorphisms described, with regard to exon 11. b) Sequence showing a homozygous (left, see a clear T base) and a heterozygous individual (right, note T and A bases) at position 128723. c) Sequence showing a homozygous (left, see a clear C base) and a heterozygous individual (right, note C and A bases) at position 128943.

Altogether our results suggest that the polymorphisms in the CARD15 gene predisposing to CD may not be linked to uveitis. Similar findings have been reported for ankylosing spondylitis [22], aggressive periodontitis [16], or Behçet's disease [1,21], where no differences were found for these CARD15 mutations between patients and controls. In addition, a study carried out in 52 patients with sarcoidosis, it was concluded that uveitis, a feature that may appear in some, but not all, patients with sarcoidosis, was not linked to CARD15 mutations [13].

The fact that the frequency of the polymorphisms studied in uveitis patients do not differ from that of the control group, does not discard this gene be responsible for the susceptibility to present uveitis. Other regions of the CARD15 gene may be involved. In fact, this is the situation in other inflammatory diseases.

Blau syndrome (BS, MIM 186580) is a rare Mendelian trait with autosomal-dominant inheritance, characterized by multiorgan granulomatous inflammation of the skin, eyes and joints [3]. In this disease, CARD15 is mutated in the NOD domain of the

molecule, a region different to that of CD [14,23]. Interestingly, uveitis is also present in this syndrome, and it is thus conceivable that our patients may present mutations in this region. Ongoing work in our laboratory will focus on this issue.

Analysis of the 5' and 3' exon 11 flanking regions.

The fact that all the individuals bearing the A → T transition in the 5' flanking region, bore also the C → A mutation in the 3' region is intriguing. This prompted us to analyze the DNA sequences, to determine whether these changes had any effect on the exon/intron structure of the gene, or on the generation of new splicing sites. Analysis carried out with GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>), FCG-NESH (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) and GRAIL (<http://grail.lsd.ornl.gov/grailexp/>) softwares, suggested that these polymorphisms apparently induced no change. The A → T transition may affect the so called branch point, an adenosine located 20–50 bases from the splice site, and important for the lariat formation during the correct mRNA splicing. Further

sequencing and biochemical analyses are required to confirm this hypothesis.

In summary our data suggest that none of the CARD15 mutations linked to CD seem to be involved in the pathogenesis of idiopathic uveitis. However, to reach firmly based statistical conclusions, increasing number of patients are required. This involves multi-centric cooperation, which would then allow gathering the adequate number of carefully selected patients with idiopathic uveitis. Moreover, we describe a new intronic polymorphism affecting simultaneously two positions, one at the 5' boundaries and the other at the 3' boundaries of exon 11. To our knowledge, this is the first report on the CARD15 gene in idiopathic uveitis.

## Acknowledgments

Grant support: This work was supported by a grant from La Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña Automovilista. N R-P and A. A-B are grant recipients from the Universidad Complutense de Madrid.

We are most grateful to Dr. E. Gómez de la Concha and his group (Servicio de Inmunología, Hospital Clínico. Madrid) for help with the Real-Time PCR 7900 HT Fast System, and to Dr. P. Reche (Inmunología, Facultad de Medicina. UCM, Madrid) for help with the GENSCAN, FCGNESH and GRAIL softwares

## References

- [1] T. Ahmad, L. Zhang, F. Gogus, D. Verity, G. Wallace, W. Madanat, F. Fayyad, T. James, M. Neville, C. Kanawati, F. Fortune, A. Celik, M. Stanford, D.P. Jewell and S.E. Marshall, CARD15 polymorphisms in Behcet's disease, *Scand J Rheumatol* **34** (2005), 233–237.
- [2] A.A. Banares, J.A. Jover, B. Fernandez-Gutierrez, J.M. Benitez del Castillo, J. Garcia, F. Gonzalez, J.A. Lopez and C. Hernandez-Garcia, Bowel inflammation in anterior uveitis and spondyloarthropathy, *J Rheumatol* **22** (1995), 1112–1117.
- [3] E.B. Blau, Familial granulomatous arthritis, iritis, and rash, *J Pediatr* **107** (1985), 689–693.
- [4] C. De Diego, M. Alcantara, J. Valle, M.J. Perez-Grueso, C. Munoz-Rosas, J.M. Carrobes and P. Martinez-Castro, Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: genotype-phenotype correlation, *Genet Test* **10** (2006), 178–185.
- [5] L. Eckmann and M. Karin, NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? *Immunity* **22** (2005), 661–667.
- [6] F.D. Ghanchi and B.J. Rembacken, Inflammatory bowel disease and the eye, *Surv Ophthalmol* **48** (2003), 663–676.
- [7] J.P. Hugot, M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J.P. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C.A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J.F. Colombel, M. Sahbatou and G. Thomas, Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* **411** (2001), 599–603.
- [8] N. Inohara and G. Nunez, NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis, *Nat Rev Immunol* **3** (2003), 371–382.
- [9] D.A. Jabs, R.B. Nussenblatt and J.T. Rosenbaum, Standardization of Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group, Standardization of uveitis nomenclature for reporting clinical data. Results of the First International Workshop, *Am J Ophthalmol* **140** (2005), 509–516.
- [10] S. Lesage, H. Zouali, J.P. Cezard, J.F. Colombel, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, R. Modigliani, C. Gower-Rousseau, J. Macry, F. Merlin, M. Chamaillard, A.S. Jannot, G. Thomas and J.P. Hugot, EPWG-IBD Group, EPIMAD Group, GETAID Group, CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease, *Am J Hum Genet* **70** (2002), 845–857.
- [11] J. Li, T. Moran, E. Swanson, C. Julian, J. Harris, D.K. Bonen, M. Hedl, D.L. Nicolae, C. Abraham and J.H. Cho, Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations, *Hum Mol Genet* **13** (2004), 1715–1725.
- [12] T.M. Martin and J.T. Rosenbaum, Genetics in uveitis, *Int Ophthalmol Clin* **45** (2005), 15–30.
- [13] T.M. Martin, T.M. Doyle, J.R. Smith, D. Dinulescu, K. Rust and J.T. Rosenbaum, Uveitis in patients with sarcoidosis is not associated with mutations in NOD2 (CARD15), *Am J Ophthalmol* **136** (2003), 933–935.
- [14] C. Miceli-Richard, S. Lesage, M. Rybojad, A.M. Prieur, S. Manouvrier-Hanu, R. Hafner, M. Chamaillard, H. Zouali, G. Thomas and J.P. Hugot, CARD15 mutations in Blau syndrome, *Nat Genet* **29** (2001), 19–20.
- [15] S. Munoz-Fernandez and E. Martin-Mola, Uveitis, *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20** (2006), 487–505.
- [16] B. Noack, H. Gorgens, T. Hoffmann and H.K. Schackert, CARD15 gene variants in aggressive periodontitis, *J Clin Periodontol* **33** (2006), 779–783.
- [17] C. Nunez, M. Barreiro, J.E. Dominguez-Munoz, A. Lorenzo, C. Zapata and A.S. Pena, CARD15 mutations in patients with Crohn's disease in a homogeneous Spanish population, *Am J Gastroenterol* **99** (2004), 450–456.
- [18] Y. Ogura, D.K. Bonen, N. Inohara, D.L. Nicolae, F.F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R.H. Duerr, J.P. Achkar, S.R. Brant, T.M. Bayless, B.S. Kirschner, S.B. Hanauer, G. Nunez and J.H. Cho, A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease, *Nature* **411** (2001), 603–606.
- [19] S. Schreiber, A. Raedler, W.F. Stenson and R.P. MacDermott, The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease, *Gastroenterol Clin North Am* **21** (1992), 451–502.
- [20] R.L. Smit, G.S. Baarsma and J. de Vries, Classification of 750 consecutive uveitis patients in the Rotterdam Eye Hospital, *Int Ophthalmol* **17** (1993), 71–76.
- [21] F.A. Uyar, G. Saruhan-Direskeneli and A. Gul, Common Crohn's disease-predisposing variants of the CARD15/NOD2 gene are not associated with Behcet's disease in Turkey, *Clin Exp Rheumatol* **22** (2004), S50–S52.

- [22] M. van der Paardt, J.B. Crusius, M.H. de Koning, L.S. Murillo, R.J. van de Stadt, B.A. Dijkmans, A.S. Pena and I.E. van der Horst-Bruinsma, CARD15 gene mutations are not associated with ankylosing spondylitis, *Genes Immun* **4** (2003), 77–78.
- [23] M.M. van Duist, M. Albrecht, M. Podswiadek, D. Giachino, T. Lengauer, L. Punzi and M. De Marchi, A new CARD15 mutation in Blau syndrome, *Eur J Hum Genet* **13** (2005), 742–747.

*CURRÍCULUM VITAE*

NOELIA RODRÍGUEZ PÉREZ

Madrid Abril 2009

---

---

**DATOS PERSONALES**

---

APELLIDOS: **RODRÍGUEZ PÉREZ**NOMBRE: **NOELIA**SEXO: **M**D.N.I.: **70055318**FECHA NACIMIENTO: **06/01/1981**DIRECCIÓN PARTICULAR: **C/ PARDO SANTALLANA Nº 35 1º F**CIUDAD: **COLLADO VILLALBA** DISTRITO POSTAL: **28400** TELÉFONO:**650173333/918511340**CORREO ELECTRÓNICO: [noeliardp@yahoo.es](mailto:noeliardp@yahoo.es)

---

**FORMACIÓN ACADÉMICA**

---

LICENCIATURA: Ciencias Biológicas

CENTRO: Universidad Complutense de Madrid

FECHA: 1999-2004

---

**SITUACIÓN PROFESIONAL ACTUAL Y FECHA DE INICIO**

---

Desempleada desde abril 2009

---

**ACTIVIDADES ANTERIORES DE CARÁCTER CIENTÍFICO O PROFESIONAL**

---

FECHA	PUESTO	INSTITUCIÓN
Septiembre2004	Asistente voluntario	Dpto. Microbiología I-Inmunología FACULTAD MEDICINA (UCM)
Abril2005-Abril2007	Becaria predoctoral UCM	Dpto. Microbiología I-Inmunología FACULTAD MEDICINA (UCM)
Abril2007-Abril2009	Investigador en formación	Dpto. Microbiología I-Inmunología FACULTAD MEDICINA (UCM)

---

**IDIOMAS DE INTERÉS CIENTÍFICO (B = bien)**

---

IDIOMA	HABLA	LEE	ESCRIBE
Inglés (A.2 E.O.I)	B	B	B

Certificado de Ciclo Elemental

## PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN LOS QUE HA PARTICIPADO

---

*TÍTULO: Estudio del gen Nod2/CARD15 en pacientes con uveítis anterior, intermedia, posterior e infecciosa.*

*ENTIDAD FINANCIADORA: Fundación de la Mutua Madrileña Automovilística*

*PERÍODO: 2004-2006*

*INVESTIGADOR PRINCIPAL: J.M. Martín Villa*

*TÍTULO: Expresión de la cadena zeta del complejo CD3 del receptor de la célula T en pacientes con adenocarcinoma gástrico.*

*ENTIDAD FINANCIADORA: FIS (Instituto de Salud Carlos III)*

*PERÍODO: 2006-2009*

*INVESTIGADOR PRINCIPAL: J.M. Martín Villa*

## COMUNICACIONES A CONGRESOS

---

### NACIONALES

AUTORES: López Santalla M, González Gujel E, Gómez Escalonilla C, Rodríguez Juan C, Pérez Blas M, Aguilera Montilla N, Valeri Lozano AP, **Rodríguez Pérez N**, Aguinaga Barrilero A, Martín-Villa JM

TÍTULO: Los pacientes con esclerosis múltiple (EM) carecen de anticuerpos antiseroalbúmina bovina (BSA).

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: XXXI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Córdoba

AÑO: 2005

AUTORES: López Santalla M. Gómez Gujel E. Gómez Escalonilla C. Rodríguez Juan C. Pérez Blas M. Aguilera Montilla N. Valeri Lozano A. **Rodríguez Pérez N**. Aguinaga Barrilero A. Martín Villa J.M.

TÍTULO: Ausencia de anticuerpos anti seroalbúmina bovina (BSA) en pacientes con esclerosis múltiple (EM).

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster

CONGRESO: Reunión Anual de la Sociedad Española de Gastroenterología

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid

AÑO: 2005



AUTORES: Gorroño M.B, **Rodríguez Pérez N.**, Barrilero A., Martín Villa J.M.  
TÍTULO: Estudio del gen NOD2/CARD15 en pacientes con uveítis.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral  
CONGRESO: 19ª Reunión Nacional del Grupo Español Multicéntrico de Uveítis.  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Barcelona AÑO: 2006

AUTORES: **Rodríguez Pérez N.**, Gorroño M.B, Aguinaga A., Martín Villa J.M.  
TÍTULO: Análisis del exón 11 del gen CARD15 en las uveítis idiopáticas.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral  
CONGRESO: 20ª Reunión Nacional del Grupo Español Multicéntrico de Uveítis.  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Madrid AÑO: 2007

AUTORES: **Rodríguez Pérez N.**, Gorroño MB, Aguinaga A, Pérez Blas M, Martín Villa JM  
TÍTULO: Análisis del exón 11 del gen CARD15 en uveítis idiopática.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral  
CONGRESO: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada AÑO: 2007

AUTORES: Aguinaga Barrilero A, Pérez Blas M, **Rodríguez Pérez N.**, Gutiérrez A, Martín J, Gómez R, Martín Villa JM  
TÍTULO: Análisis de la secuencia del ARNm de CD3Z en 13 pacientes con adenocarcinoma gástrico.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster  
CONGRESO: XXXIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada AÑO: 2007

AUTORES: **Rodríguez Pérez N.**, Aguinaga A, Gorroño MB, Pérez Blas M, Martín Villa JM  
TÍTULO: Análisis de los polimorfismos R334W, R334Q y L469F del gen CARD15 en uveítis idiopática.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster  
CONGRESO: XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología  
LUGAR DE CELEBRACIÓN: Mallorca AÑO: 2008

### INTERNACIONALES

AUTORES: **Rodríguez Pérez N.**, Barrilero A., Gorroño M.B, Pérez Blas M, López Santalla M, Martín Villa J.M.  
TÍTULO: Analysis of the CARD15 gene in spanish patients with idiopathic uveitis.  
TIPO DE PARTICIPACIÓN: Póster  
CONGRESO: *1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology - 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology*

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Paris

AÑO: 2006

AUTORES: **Rodríguez Pérez N.**, Aguinaga Barrilero A., Gorroño Echebarria M.B, Pérez Blas M, Martín Villa J.M.

TÍTULO: Analysis of the Crohn's disease-related CARD15 polymorphisms in spanish patients with uveitis.

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Comunicación oral

CONGRESO: **9<sup>th</sup> International Congress IOIS**

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Paris

AÑO: 2007

Registro de dos secuencias en el GenBank: DQ869189 y FJ755457.

---

## ARTÍCULOS

Rodríguez-Pérez N, Aguinaga-Barrilero A, Gorroño-Echebarria MB, Pérez-Blas M, Martín-Villa JM. *Analysis of Crohn's disease-related CARD15 polymorphisms in Spanish patients with idiopathic uveitis*. Disease Markers. 2008; 24(2):111-7.

*Blau syndrome-related CARD15 mutations are not linked to idiopathic uveitis in spanish patients* (En publicación en Disease Markers, 2009).

---

## OTRA FORMACIÓN ACADÉMICA

- Experiencia docente: colaboración docente impartiendo prácticas de la asignatura Inmunología, los cursos 2007/2008 y 2008/2009.
- Curso "Realidad actual de las aplicaciones de la patología molecular" FMMA.
- Curso "Citometría de flujo" CIEMAT.
- Programa de doctorado "Inmunología". Realización de los cursos de doctorado: "Respuesta inmune: bases celulares y moleculares" (Sobresaliente), "Temas de investigación en inmunología" (Sobresaliente), "Base molecular y terapéutica de las inmunodeficiencias congénitas y adquiridas" (Sobresaliente). Curso académico 2004-2005.
- Obtención del diploma de estudios avanzados. Curso académico 2006.
- Curso CAP 2008.
- Curso de "Diseño e implantación de sistemas APPCC en la industria alimentaria".

---

## ACTIVIDADES CIENTÍFICO-TÉCNICAS

---

### Técnicas Biología Molecular

- Extracción de DNA genómico
- PCR y PCR-RFLP
- Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida
- Ensayos de genotipado con sondas TaqMan

- ELISA indirecto
- Western blot

---

### **GRANDES EQUIPOS QUE UTILIZA O HA UTILIZADO**

---

- Applied Biosystems Real-Time PCR 7900 HT Fast System
- Microscopio óptico
- Centrífuga
- Autoclave
- Gel Doc
- Espectrofotómetro, nanodrop
- Speed vac
- Cabina de *DNA/RNA* y de flujo laminar
- Lector placas ELISA